



**You have downloaded a document from  
RE-BUS  
repository of the University of Silesia in Katowice**

**Title:** Badanie składu jakościowego i ilościowego wybranych gatunków tymianku oraz ich właściwości biologicznych

**Author:** Marta Orłowska

**Citation style:** Orłowska Marta. (2016). Badanie składu jakościowego i ilościowego wybranych gatunków tymianku oraz ich właściwości biologicznych. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIWERSYTET ŚLĄSKI  
W KATOWICACH



Biblioteka  
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

**UNIwersYTET ŚLĄSKI**  
**Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii**  
**Instytut Chemii Uniwersytetu Śląskiego**



## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**mgr Marta Orłowska**

**Badanie składu jakościowego i ilościowego wybranych  
gatunków tymianku oraz ich właściwości biologicznych**

**Promotor:**

**dr hab. Mieczysław Sajewicz**

**Katowice 2016**

**PRAGNĘ PODZIĘKOWAĆ:**

Promotorowi DR HAB. MIECZYŚLAWOWI SAJEWICZOWI za wszelką pomoc jaką mi  
udzielił w trakcie całej współpracy, za cenne uwagi merytoryczne.  
Dziękuję za możliwość przeprowadzenia badań oraz za ogromną cierpliwość,  
wrozumiałość i pomoc w chwilach zwątpienia.

PANI PROF. DR HAB. TERESIE KOWALSKIEJ,  
za cenne uwagi i sugestie podczas realizacji tej pracy.

Podziękowania kieruję również do NAJBLIŻSZYCH,  
za okazane wsparcie oraz cierpliwość.

## Spis treści

A. Streszczenie .....	5
B. Summary .....	7
C. Spis akronimów wykorzystanych w pracy .....	9
I. Wstęp.....	11
II. Część literaturowa .....	13
1. Tymianek .....	14
2. Krótka charakterystyka związków chemicznych występujących w badanych roślinach .....	17
2.1. Olejki eteryczne .....	17
2.2. Polifenole .....	22
2.2.1. Kwasy fenolowe.....	22
2.2.2. Flawonoidy .....	28
3. Opis wybranych właściwości biologicznych roślin .....	34
3.1. Właściwości przeciwutleniające .....	34
3.2. Właściwości przeciwbakteryjne.....	39
3.3. Właściwości przeciwnowotworowe.....	42
III. Cele pracy .....	45
IV. Część doświadczalna .....	46
1. Aparatura i odczynniki.....	47
2. Materiał roślinny .....	50
3. Metody ekstrakcji wykorzystane w badaniach.....	52
3.1. Związki lotne .....	52
3.1.1. Ekstrakcja w aparacie Derynga.....	52
3.1.2. Analiza fazy nadpowierzchniowej .....	52
3.2. Związki nielotne .....	52
3.2.1. Wielostopniowa ekstrakcja związków fenolowych z materiału roślinnego .....	52
3.2.2. Chemometryczna optymalizacja warunków ekstrakcji .....	58
4. Porównanie chromatograficznych fingerprintów dla roślin z rodziny jasnotowatych: szalwii, tymianku oraz pszczelnika .....	68
4.1. Chromatografia cienkowarstwowa .....	68

4.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa .....	74
5. Analiza lotnej frakcji wybranych gatunków tymianku .....	85
6. Chemometryczne porównanie zawartości związków fenolowych dla sześciu wybranych gatunków tymianku .....	98
7. Porównanie składu chemicznego ekstraktów dla wybranych gatunków tymianku.....	103
7.1. Chromatografia cienkowarstwowa .....	103
7.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa .....	105
8. Analiza właściwości przeciwbakteryjnych dla wybranych gatunków tymianku .....	111
9. Analiza właściwości przeciwutleniających dla wybranych gatunków tymianku.....	115
9.1. Test dot blot z zastosowaniem odczynnika DPPH.....	115
9.2. Spektroskopia elektronowego rezonansu (EPR) z zastosowaniem odczynnika DPPH.....	117
9.3. Spektrofotometria UV-Vis z zastosowaniem odczynnika DPPH .....	120
9.4. Spektrofotometria UV-Vis z zastosowaniem odczynnika ABTS .....	124
10. Analiza właściwości przeciwnowotworowych dla wybranych gatunków tymianku .....	127
11. Wyniki analiz właściwości biologicznych wybranych gatunków tymianku.....	130
12. Analiza chemometryczna właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwutleniających oraz przeciwnowotworowych .....	132
12.1. Analiza chemometryczna właściwości przeciwutleniających.....	132
12.2. Analiza chemometryczna badanych właściwości biologicznych.....	135
13. Podsumowanie .....	140
14. Finansowanie .....	142
15. Dorobek naukowy .....	143
15.1. Publikacje naukowe .....	143
15.2. Wystąpienia ustne .....	143
15.3. Plakaty .....	144
V. Curriculum Vitae .....	148
VI. Literatura .....	149

## A. Streszczenie

Surowce zielarskie przeżywają obecnie swój renesans. Wykorzystanie ziół, zarówno pojedynczych jak i mieszanek, w domowym lecznictwie znane jest od najdawniejszych czasów. Do tej pory nie określono pełnego składu chemicznego poszczególnych roślin uważanych za lecznicze i dlatego na szczególną uwagę zasługują te badania, które mają na celu ustalenie takiego składu dla poszczególnych roślin leczniczych, a następnie sklasyfikowanie ich pod tym względem. Dziedziną nauki zajmującą się klasyfikacją związków pod względem składu chemicznego jest chemotaksonomia, będąca jedną z gałęzi taksonomii.

W przedstawionej pracy doktorskiej jako materiał badawczy wykorzystano 18 różnych roślin należących do rodzaju tymianków (*Thymus* L.), które zaliczamy do rodziny wargowych (*Lamiaceae*). Najpopularniejszym gatunkiem należącym do tej grupy jest tymianek pospolity (*Thymus vulgaris* L.). Roślina ta wykorzystywana jest zarówno w medycynie, jak i w kosmetyce, ale również znalazła szerokie zastosowanie jako przyprawa.

Przeprowadzone badania, które mają na celu przeanalizowanie frakcji lotnej i nielotnej oraz właściwości biologicznych, można podzielić na następujące etapy:

1. W pierwszym etapie badań określono skład frakcji lotnej poszczególnych gatunków tymianku wykorzystując metodę analizy fazy nadpowierzchniowej techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HS-GC-MS). Ponadto, dla trzech wybranych gatunków frakcję lotną wyodrębniono przeprowadzając destylację z parą wodną w aparacie Derynga, a następnie określono skład chemiczny otrzymanych olejków eterycznych przy pomocy chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).
2. W drugim etapie badań analizie poddano frakcję nielotną. Najpierw przeprowadzono chemometryczną optymalizację warunków ekstrakcji frakcji fenolowej dla gatunku tymianku pospolitego. W tym celu porównano ekstrakcję w aparacie Soxhleta z przyspieszoną ekstrakcją rozpuszczalnikową (ASE) w różnych warunkach prowadzenia tego procesu. Następnie zarejestrowano chromatogramy technikami chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w celu porównania badanych gatunków tymianku. Chromatogramy te mogą stanowić podstawę do stworzenia chromatograficznych „odcisków palca” (tzw. fingerprintów) ekstraktów frakcji fenolowej.

3. W kolejnym etapie skupiono się na określeniu właściwości biologicznych odpowiednio przygotowanych ekstraktów. W niniejszej pracy określono następujące właściwości badanych gatunków tymianku:

- ✓ **przeciwutleniające** (antyoksydacyjne) stosując dwa typowe odczynniki o charakterze stabilnych wolnych rodników, tj. DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu) i ABTS (2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)). W tym celu wykorzystano trzy metody analityczne: spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), spektrofotometrię UV-Vis oraz test dot-blot.
- ✓ **przeciwbakteryjne** techniką chromatografii cienkowarstwowej z detekcją biologiczną realizowaną metodą bioautografii bezpośredniej (TLC-DB).
- ✓ **przeciwnowotworowe** względem ludzkich komórek raka okrężnicy przy użyciu testu kolorymetrycznego MTS.

Wyniki przeprowadzonych badań składają się na pewną szerszą całość, stanowiącą stosunkowo wszechstronne porównanie 18 gatunków i rodzajów tymianku pod względem ich właściwości leczniczych.

## B. Summary

Nowadays, a renaissance of curative plants is observed, which have been re-discovered worldwide. Herbal medicines in form of individual plants or plant mixtures have been utilized in human households from the times immemorial. However, an exact knowledge of chemical composition of most curative plants still remains unknown and therefore particular attention should be paid to the investigations on chemical composition of individual curative plants, with a possible classification thereof based on chemical composition. Scientific field focusing on classification of plants based on their chemical composition is known as chemotaxonomy, which is a branch of taxonomy.

In this study, the research material is presented valid for eighteen different plants from the thyme (*Thymus* L.) genus, which belong to the mint (*Lamiaceae*) family. One of the most representative specimens from the thyme genus is common thyme (*Thymus vulgaris* L.). This particular plant has found different applications in medicine and cosmetics, but also as a culinary spice. At the initial stage of this study, composition of the volatile fraction of the investigated thyme species was investigated with use of the headspace gas chromatography with mass spectrometric detection (HS-GC-MS). Moreover, volatile fraction for three different thyme species was isolated through hydrodistillation in the Deryng's apparatus, and then its chemical composition was assessed with use of gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS).

Next step was the analysis of the non-volatile fraction. Firstly, chemometrical optimization of the extraction procedure targeting the phenolics fraction was performed upon an example of common thyme. To this effect, a comparison was performed of the extraction procedure carried out in the Soxhlet's apparatus with that performed with use of the accelerated solvent extraction (ASE), playing with different working parameters. Then the chromatographic "fingerprints" of the phenolic fraction extracts were recorded with use of the thin-layer chromatography (TLC) and the high-performance liquid chromatography (HPLC), in order to compare the investigated thyme species.

Eventually, one focused on the evaluation of biological properties of the extracts obtained under the optimal working parameters. In the framework of this study, the following biological properties of the investigated thyme species have been assessed:

- ✓ **antioxidant** properties with use of the two compounds acting as stable free radicals, i.e., DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic). For this purpose, three different analytical techniques were applied, i.e., the spectroscopy of electron paramagnetic resonance (EPR), the UV-Vis spectrophotometry, and the dot-blot test.



- ✓ **antibacterial** properties with use of the thin-layer chromatography with biological detection performed as direct bioautography (TLC-DB).
- ✓ **anticancer** properties against the human colon adenocarcinoma cells with use of the colorimetric MTS test.

The results obtained in this study make a relatively coherent yet broad entity which provides a comparison of the eighteen thyme specimens and species in terms of their curative properties.

### C. Spis akronimów wykorzystanych w pracy

Akronim	Termin polskojęzyczny	Termin anglojęzyczny
ABTS	2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)	2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic
ASE	przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem	accelerated solvent extraction
BHA	butylowany hydroksyanizol	butylated hydroxyanizole
BHT	butylowany hydroksytoluen	butylated hydroxytoluene
CCD	centralny plan kompozycyjny	central composite design
COW	metoda zoptymalizowanego nakładania sygnałów maksymalizująca ich wzajemną korelację	correlation optimized warping
CUPRAC	metoda oparta na redukcji kompleksu neokuproiny z jonami Cu(II)	cupric reducing antioxidant capacity
DAD	detektor z matrycą diodową	diode array detector
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELSD	fotodyspersyjny detektor laserowy	evaporative light scattering detector
EPR	spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego	electron paramagnetic resonance spectroscopy
FRAP	metoda oparta na redukcji kompleksu Fe(III)-TPTZ	ferric ion reducing antioxidant parameter
GC - MS	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas	gas chromatography - mass spectrometry
HAT	mechanizm przeniesienia atomu wodoru	hydrogen atom transfer
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa	high performance liquid chromatography
HS - GC - MS	analiza fazy nadpowierzchniowej techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas	headspace gas chromatography - mass spectrometry
MAE	ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	microwave assisted extraction

MSPD	ekstrakcja rozpuszczalnikiem z próbki zmieszanej wypełniaczem	matrix solid phase dispersion
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ORAC	metoda oznaczania zdolności absorpcji rodników tlenowych	oxygen radical absorbance capacity
PALS	metoda asymetrycznych najmniejszych kwadratów z funkcją kary	penalized asymmetric least squares
PCA	analiza czynników głównych	principal component analysis
RNS	reaktywne formy azotu	reactive nitrogen species
ROS	reaktywne formy tlenu	reactive oxygen species
RSM	metoda odpowiedzi powierzchni	response surface methodology
RSS	reaktywne formy siarki	reactive sulfur species
SET	mechanizmu przeniesienia pojedynczego elektronu	single electron transfer
SFE	ekstrakcja przy pomocy płynu w stanie nadkrytycznym	supercritical fluid extraction
SPE	ekstrakcja do fazy stałej	solid phase extraction
SPME	mikroekstrakcja do fazy stałej	solid phase microextraction
TBHQ	tert-butylohydrochinon	tert-butylhydroquinone
TLC	chromatografia cienkowarstwowa	thin layer chromatography
TLC - DB	bioautografia bezpośrednia połączona z chromatografią cienkowarstwową	thin-layer chromatography coupled with direct bioautography
TRAP	metoda oznaczania całkowitej zdolności wychwytywania wolnych rodników	total radical trapping antioxidant parameter
UAE	ekstrakcja przy pomocy rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami	ultrasound assisted extraction

## I. Wstęp

Aktualnie możemy zaobserwować powrót do starych metod terapii w leczeniu chorób, jak i odkrywanie na nowo dawnych surowców zielarskich - oczywiście zgodnie ze współczesną wiedzą. Spośród ponad 400 000 gatunków roślin skatalogowanych na Ziemi, za lecznicze uważa się około 40 000. Dokładnie przebadanych zostało natomiast zaledwie parę tysięcy (1-1,5%) [1].

Ziołami określa się rośliny lecznicze zawierające związki chemiczne o właściwościach specyficznego oddziaływania na organizm, natomiast metodę wykorzystującą do leczenia bogactwo surowców naturalnych występujących w przyrodzie (głównie w świecie roślin) nazwano ziołolecznictwem, określanym obecnie częściej mianem fitoterapii. Światowa produkcja ziół jest szacowana obecnie na ponad 5 000 000 ton rocznie; produkcja obejmuje między innymi zioła wykorzystywane do celów wyłącznie farmaceutycznych. Rynki europejskie uważa się za najważniejsze i najlepiej zorganizowane w tym zakresie. W obrocie znajduje się około 2 000 gatunków roślin leczniczych i aromatycznych. W krajach Unii Europejskiej zioła uprawia się na powierzchni 70 000 ha, a głównymi producentami są m.in. Francja, Niemcy, czy Polska. W Polsce plantacje zielarskie zajmują powierzchnię około 30 000 ha, gdzie uprawia się obecnie 29 oryginalnych odmian roślin zielarskich. Około 70% skupowanych w naszym kraju surowców zielarskich jest przeznaczonych na rynek krajowy do dalszego przetwórstwa, głównie na leki roślinne oraz wyroby spożywcze i kosmetyki. Pozostała część jest eksportowana, głównie do krajów Unii Europejskiej [2, 3].

Taksonomia jest to nauka o zasadach i metodach klasyfikowania, w szczególności obejmująca tworzenie i opisywanie jednostek systematycznych: taksonów. Jedną z szybko rozwijających się dziedzin taksonomii jest chemotaksonomia, inaczej nazywana taksonomią chemiczną lub chemiczną systematyką roślin. Wykorzystuje ona dane chemiczne w celu ulepszenia klasyfikacji roślin. Jest to nowa metoda, która dostarcza szczegółowych informacji dotyczących roślin. Dzięki temu otrzymujemy szereg danych, które są wykorzystywane podczas ich klasyfikacji. Istnieją trzy główne powody dynamicznego rozwoju chemotaksonomii:

- ✓ rozwój wielu nowych metod izolacji i technik analitycznych, dzięki którym analiza produktów roślinnych jest łatwiejsza i szybsza oraz dostarcza dokładniejszych informacji,
- ✓ uświadomienie faktu, że poza występowaniem u roślin wielu podstawowych szlaków biochemicznych istnieje ogromne zróżnicowanie pomiędzy taksonami w odniesieniu do wielu innych, mniej podstawowych szlaków biochemicznych,

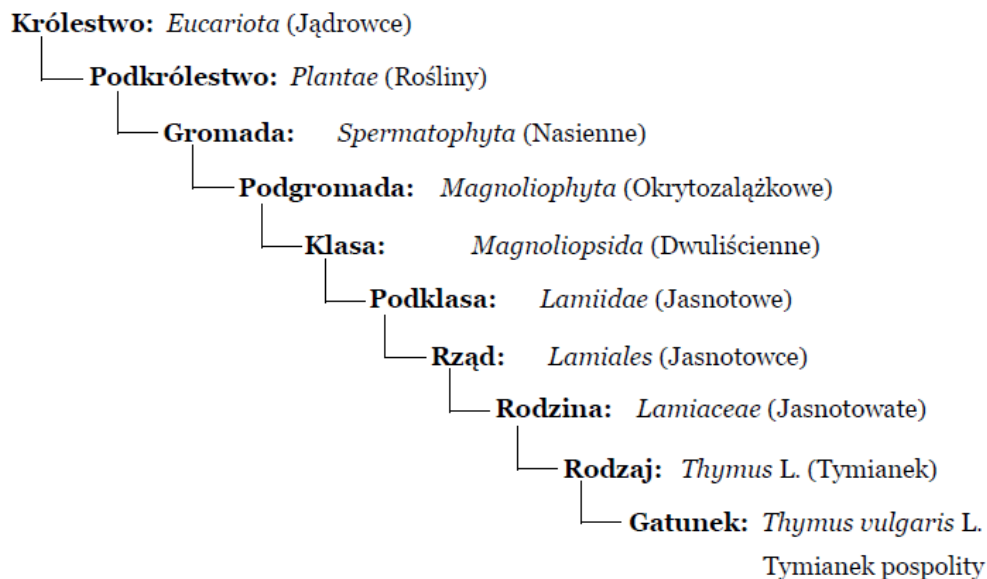
- ✓ konieczność wykorzystywania danych pochodzących z jak największej liczby źródeł, w celu dokonania klasyfikacji roślin [4].

Przedmiotem przedstawionych badań jest roślina lecznicza, tymianek. Tymianek pospolity (*Thymus vulgaris* L.) jest rośliną pochodzącą z basenu Morza Śródziemnego, o charakterystycznym wyglądzie listków i fioletowym odcieniu kwiatostanu. Wykazuje szerokie zastosowanie w lecznictwie, kosmetyce oraz kuchni. Obszerne badania fitochemiczne dotyczące składu chemicznego tej rośliny pokazują, iż zostało w niej zidentyfikowanych kilka klas bioaktywnych związków chemicznych, takich jak: kwasy fenolowe, flawonoidy, terpenoidy czy olejki eteryczne. Tymianek wykazuje różne korzystne właściwości farmakologiczne, takie jak: antyseptyczne, antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwskurczowe czy wykrztuśne [5-8].

## **II. Część literaturowa**

## 1. Tymianek

Tymianek pospolity (*Thymus vulgaris* L.) jest to drobny półkrzew z rodziny wargowych (*Lamiaceae*), a do jego rodzaju zaliczamy około 350 gatunków. Rośnie dziko na wybrzeżach Morza Śródziemnego oraz w Ameryce Południowej. Jego nazwa wywodzi się z języka greckiego od wyrazu „thymos”, oznaczającego odwagę, męstwo oraz siłę, co wiązało się z pobudzającym działaniem tej rośliny, bądź od egipskiego „tham” lub „thym” - składać ofiarę, gdyż jeszcze w starożytnym Egipcie roślina ta była jednym z głównych składników kadzideł i substancji służących do balsamowania zwłok. Jest on uprawiany jako roślina przyprawowa i lecznicza w wielu krajach Europy i Ameryki. Gatunek ten ma rozgałęzioną, wzniesioną łodygę osiagającą wysokość do 40 cm, w dolnej części zdrewniałą. Roślina ta posiada drobne, wyrastające parami, krótkoogonkowe lub siedzące, kształtu eliptycznego, całobrzegie, od strony dolnej szarawo owłosione liście. Kwiaty drobne, grzbieciste, dwuwargowe, o koronie koloru różowoliliowego lub jasnofioletowego, zebrane w pozorne okółki, tworzące szczytowe, skupione groniaste kwiatostany. Cała roślina ma swoisty, aromatyczny, przyjemny zapach tymolowy [9-15].



Rys.1. Systematyka tymianku pospolitego [16].

W lecznictwie oraz w kosmetologii jako surowiec wyjściowy stosuje się ziele tymianku, w którego skład chemiczny wchodzi takie związki, jak:

- ✓ olejki eteryczne,
- ✓ związki garbnikowe,
- ✓ kwasy polifenolowe,
- ✓ flawonoidy,
- ✓ saponiny,
- ✓ sole mineralne.

W zależności od pochodzenia materiału roślinnego, terminu zbioru, warunków suszenia oraz przechowywania surowca skład chemiczny materiału roślinnego może być różny [17-24].

W medycynie tymianek pospolity wykorzystywany jest głównie w leczeniu zapalenia górnych dróg oddechowych i zaburzeniach czynności przewodu pokarmowego, ze względu na działanie bakteriobójcze. Zarówno ziele, jak i olejek eteryczny stosowane są do produkcji:

- ✓ past do zębów,
- ✓ płynów do ust,
- ✓ płynów do płukania gardła,
- ✓ dezynfekujących kremów,
- ✓ olejków do kąpieli.

Z leczniczych właściwości tymianku korzysta się w warunkach domowych, stosując napary, okłady, kąpiele, inhalacje lub płukanki z ziela. Zgniecione liście tymianku można przykładąć na rany oraz do miejsc po ukąszeniu owadów [25-28].

Głównym składnikiem olejku eterycznego tymianku jest tymol, który podrażnia błony śluzowe. Stosowane doustnie mogą prowadzić do wymiotów, bólów głowy, mogą również powodować krwimocz i uszkadzać nerki. Na zagrażające życiu skutki uboczne są narażone przede wszystkim dzieci oraz osoby starsze. Zatem doustne stosowanie olejku tymiankowego i tymolu wymaga konsultacji z lekarzem [26, 29].





Rys.2. Tymianek pospolity [30].

Poniżej przedstawiono charakterystykę najpowszechniej występujących gatunków tymianku:

*Thymus serpyllum* L. (macierzanka piaskowa) - drobna krzewinka rozpowszechniona w licznych odmianach niemal w całej Europie oraz środkowej i północnej Azji, a także w północnej Afryce. Produkty z zieleń macierzanki pobudzają czynność wydzielniczą błon śluzowych górnych dróg oddechowych oraz wzmacniają odruch wykrztuśny. Zawarte w zieleń macierzanki związki goryczowe usprawniają trawienie i przyswajanie pokarmów, natomiast garbniki hamują rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych w przewodzie pokarmowym. Zieleń macierzanki stosuje się również jako przyprawę, natomiast olejek macierzankowy w przemyśle spożywczym, perfumeryjnym i mydlarskim [31, 32].

*Thymus pulegioides* L. (macierzanka szerokolistna) - pospolita w całym kraju w widnych lasach, na zboczach, łąkach i przydrożach. Jest półkrzewem sięgającym do 40 cm wysokości. Może być wykorzystywana jako środek pomocniczy w leczeniu astmy i stanów zapalnych oskrzeli. Wykazuje właściwości przeciwbakteryjne i antyoksydacyjne, a ponadto jest doskonałą przyprawą do ryb i drobiu [33-35].

*Thymus mastihina* - jest niewysokim krzewem sięgającym do 30 cm wysokości, który pochodzi z Półwyspu Iberyjskiego. Jego liście są dość duże i omszone, natomiast kwiaty białe. Wydziela kamforowy lub eukaliptusowy aromat. Jest doskonałą przyprawą do mięs i sosów. Pozytywnie oddziałuje i usprawnia układ trawienny [36].

*Thymus capitatus* L. (macierzanka główkowata) - zapachem przypomina oregano. Charakteryzuje się różnymi właściwościami biologicznymi, np.: przeciwbakteryjnymi, przeciwwirusowymi oraz antyoksydacyjnymi [37].

*Thymus citriodorus* (macierzanka cytrynowa) - swoim zasięgiem obejmuje obszary śródziemnomorskie. Roślina ta wykorzystywana jest jako lokalna przyprawa, zarówno wysuszona, jak i gotowana. Wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, antyseptyczne oraz jest stosowana w leczeniu astmy oraz innych chorób dróg oddechowych [38].

## 2. Krótka charakterystyka związków chemicznych występujących w badanych roślinach

### 2.1. Olejki eteryczne

Już w czasach starożytnych znane były różne olejki eteryczne. W starożytnym Egipcie stosowano aromatyczne rośliny w wielu celach, m.in. w kosmetycznych, leczniczych czy też do balsamowania ciał. Pozyskiwanie naturalnych substancji zapachowych wiąże się jednak z bardzo dużymi kosztami, np. ze 100 kg płatków róży otrzymuje się tylko 0,5 litra olejku eterycznego. Przyczyniło się to w XIX wieku do poszukiwań innych źródeł ich pozyskiwania, co z kolei doprowadziło do wytwarzania syntetycznych substancji zapachowych. W XX wieku powrócono do badań nad olejkami. Konsekwencją tego było powstanie aromaterapii, czyli leczenia zapachami. Około 3000 olejków eterycznych jest produkowanych przy użyciu co najmniej 2000 gatunków roślin, z czego 300 jest istotnych z handlowego punktu widzenia. Rośliny produkujące omawiane związki lotne należą do różnych rodzajów zaliczanych do około 60 rodzin. Rośliny należące do takich rodzin jak: *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* czy *Rutaceae* wytwarzają duże ilości olejków eterycznych, które mają wartość leczniczą i przemysłową [39-42].

Olejki eteryczne (ang. essential oils) występujące w świecie roślinnym stanowią mieszaninę substancji lotnych, charakteryzujących się różnymi właściwościami chemicznymi. Jest to bardzo heterogenna grupa związków organicznych, pod względem właściwości fizykochemicznych oraz technologii pozyskiwania (najczęściej polegającej na destylacji z parą wodną). Do ogólnych, charakterystycznych cech olejków eterycznych można zaliczyć:

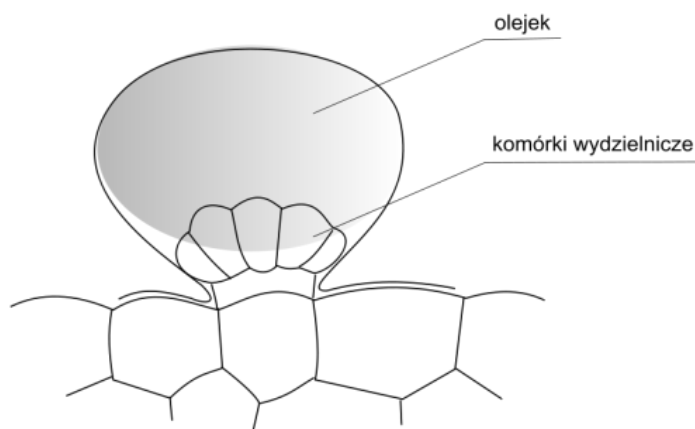
- ✓ płynną konsystencję,
- ✓ lipofilowość,
- ✓ czynność optyczną,
- ✓ charakterystyczny zapach.

W skład określonego olejku eterycznego może wchodzić kilkadziesiąt, a czasami nawet kilkaset różnych związków chemicznych. Zazwyczaj spośród oznaczanych związków lotnych jesteśmy w stanie określić główny składnik danego olejku, który nadaje mu charakterystyczny zapach oraz wpływa na jego działanie farmakologiczne. Obecnie poznano ponad 1500 związków wchodzących w skład różnych olejków eterycznych [43-46].

Olejki eteryczne pod względem chemicznym stanowią wieloskładnikowe mieszaniny związków monoterpenowych, seskwiterpenowych oraz rzadziej, diterpenowych (mowa wtedy o olejkach terpenowych) lub związków pochodnych fenylopropanu (mowa wtedy o olejkach nieterpenowych). Występujące w nich związki mają charakter węglowodorów, alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów, czy eterów. Oprócz wspomnianych związków terpenowych i pochodnych fenylopropanu, w olejkach eterycznych spotyka się również substancje siarkowe, azotowe, pochodne acetyleny, kumaryny, kwasy organiczne i inne. Skład procentowy poszczególnych składników w danym olejku jest zmienny i zależy od wielu czynników, takich jak:

- ✓ uwarunkowania genetyczne,
- ✓ zaawansowanie wegetacji,
- ✓ pochodzenie geograficzne surowca,
- ✓ czas zbioru surowca,
- ✓ sposób przechowywania surowca [47-53].

Tą mieszaninę związków lotnych zaliczamy do grupy metabolitów wtórnych, która zlokalizowana jest w różnych strukturach tkanki wydzielniczej zarówno egzogennej, jak i endogennej. Olejki eteryczne mogą znajdować się w kwiatach, liściach, korzeniach, kłaczach, cebulach, owocach, czy nasionach. Możemy spotkać różne wytwory tkanki wydzielniczej, takie jak: włoski gruczołowe, gruczoły olejkowe, komórki olejkowe, przewody i kanały olejkowe oraz żywiczne, a także zbiorniki olejkowe pochodzenia schizogenicznego i lizygenicznego [54-57].



Rys.3. Włoszek gruczołowy roślin z rodziny *Lamiaceae* (Jasnotowate) [54].

Ze względu na swój bogaty skład chemiczny olejki eteryczne wykazują różne właściwości farmakologiczne. Zazwyczaj uzależnione są one od charakteru głównych składników. Do najważniejszych właściwości leczniczych należą:

- ✓ przeciwbakteryjne [58, 59],
- ✓ antyoksydacyjne [60, 61],
- ✓ przeciwzapalne [62, 63],
- ✓ przeciwgrzybicze [64, 65],
- ✓ przeciwnowotworowe [66, 67],
- ✓ przeciwwirusowe [68, 69].

Jednym z ważnych surowców roślinnych, z których pozyskujemy olejki eteryczne jest ziele. Ziele tymianku zbierane jest podczas kwitnienia i jest ono materiałem typowo olejkowym, aromatycznym. Związki lotne otrzymujemy przez destylację z parą wodną. Olejek tymiarkowy powinien zawierać nie mniej niż 20% (200 mg/g) i nie więcej niż 45% (450 mg/g) fenoli, w przeliczeniu na sumę tymolu i karwakrolu. Poza tymi substancjami zawiera on również alkohole (borneol i linalol) oraz monoterpeny. Olejek tymiarkowy jest żółtobrunatną cieczą o zapachu tymolu. Dzięki zawartości związków fenolowych (zwłaszcza tymolu) wywiera działanie antyseptyczne (przewyższające aktywnością fenol). Jest również stosowany jako dodatek do past do zębów, płynów, żeli i maści działających antyseptycznie (stosowane są one w profilaktyce i leczeniu różnych zakażeń w obrębie jamy ustnej). Wykazuje również działanie przeciw różnym drobnoustrojom. Składniki olejku wykazują działanie wykrztuśne, pobudzają wydzielanie śluzu przez błonę śluzową układu oddechowego i wzmagają ruchy nabłonka rzęskowego. W olejku tymiarkowym zidentyfikowano 40 składników [70-79].

Tab.1. Główne składniki olejku tymiarkowego [73].

Nazwa składnika	Zawartość procentowa [%]
tymol	38,1
p-cymen	29,1
terpinen	5,2
linalol	3,7
kariofilen	3,1
karwakrol	2,3

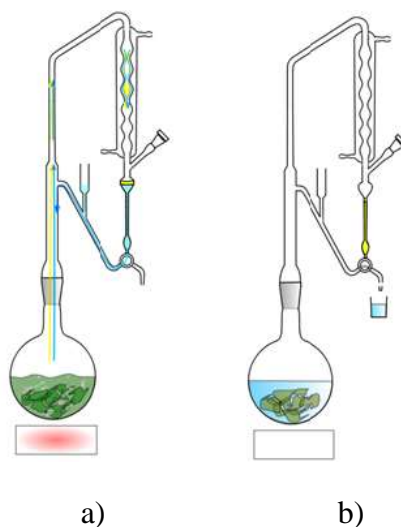


Rys.4. Struktura a) tymolu oraz jego izomeru b) karwakrolu [80].

Olejki eteryczne, jako substancje lotne, możemy wydzielać w różny sposób z materiału roślinnego. Podstawowym i głównym procesem ich pozyskiwania jest destylacja (ekstrakcja) z zastosowaniem pary wodnej, podczas której substancje zapachowe są chronione i wydzielane bez użycia pomocniczych środków chemicznych. Metoda ta jest znana już od XI wieku. Destylację należy prowadzić w odpowiednich warunkach temperatury i ciśnienia, ponieważ prowadzenie jej przy zbyt wysokim ciśnieniu i w zbyt dużej temperaturze może skutkować zniszczeniem cennych składników pozyskiwanego olejku. Należy zatem prowadzić destylację w sposób powolny i umiarkowany. Tak opisany proces przeprowadza się w aparacie Derynga, który umożliwia w łatwy sposób pozyskiwanie analizowanych substancji. W wyniku destylacji z parą wodną otrzymujemy terpeny i pochodne fenylopropanu, ale mogą również występować inne związki lotne takie, jak kumaryny, a także niskocząsteczkowe produkty degradacji kwasów tłuszczowych i związków terpenowych. Poza związkami pierwotnymi badany olejek eteryczny może zawierać składniki powstające podczas procesu jego otrzymywania, np. chamazulen (powstający z nielotnej matrycy), czy artabsyny (powstające podczas destylacji z parą wodną).

Oprócz destylacji z parą wodną olejki eteryczne można otrzymywać w inny sposób. Do dobrze poznanych technik otrzymywania należą:

- ✓ wycłaczanie,
- ✓ ekstrakcja rozpuszczalnikiem lotnym,
- ✓ maceracja [81-84].

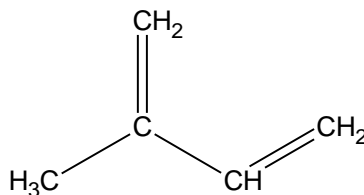


Rys.5. Destylacja z parą wodną materiału roślinnego w aparacie Derynga: a) zestaw w trakcie destylacji b) zestaw po destylacji [85].

Terpeny, inaczej nazywane izoprenoidami, są dużą grupą substancji pochodzenia naturalnego biogenetycznie pochodzącą od tzw. aktywnego izoprenu, inaczej izopentylenodifosforanu lub jego izomeru, dimetyloallilodifosforanu. Są to niewielkie cząsteczki organiczne o niezwykle zróżnicowanej budowie chemicznej. Poznane są tysiące różnych terpenów. Niektóre z nich są węglowodorami, inne zawierają tlen; niektóre z nich zawierają w swojej budowie pierścienie, a jeszcze inne są związkami otwarto-łańcuchowymi.

Tab.2. Podział terpenów [86].

Nazwa grupy	Liczba atomów węgla	Przykład substancji
monoterpeny	C <sub>10</sub>	mircen, limonen
seskwiterpeny	C <sub>15</sub>	farnezol, akoron
diterpeny	C <sub>20</sub>	fitol, marubina
sesterterpeny	C <sub>25</sub>	bardzo rzadkie w przyrodzie
triterpeny	C <sub>30</sub>	betulina, akteina
tetraterpeny	C <sub>40</sub>	karoteny, likopen
politerpeny	C <sub>5n</sub>	kauczuk, gutta



Rys.6. Struktura izoprenu (2-metylo-1,3-butadienu) [87].

Klasyfikacja terpenów opiera się na liczbie jednostek izoprenowych w strukturze. W cząsteczkach tych liczba atomów węgla jest podzielna przez 5. Wskutek reakcji wtórnych, np. oksydacji, cyklizacji czy odszczepienia niektórych podstawników, powstają inne cząsteczki, w których liczba atomów węgla nie jest podzielna przez 5, np. steroidy [87, 88].

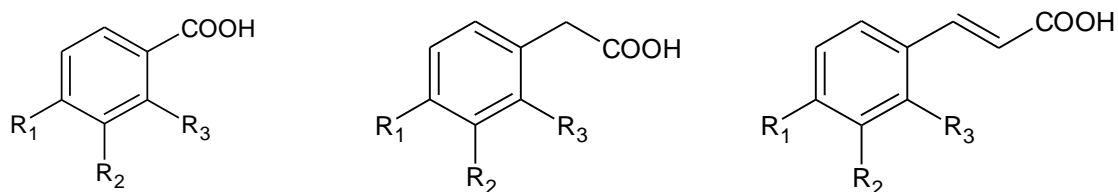
## 2.2. Polifenole

Polifenole stanowią dużą grupę cząsteczek należących do grupy wtórnych metabolitów, które są zlokalizowane w jadalnych częściach produktów roślinnych oraz w roślinach leczniczych. Związki fenolowe możemy zdefiniować jako substancje posiadające pierścień aromatyczny, z którym związana jest jedna lub więcej grup hydroksylowych oraz dodatkowo inne podstawniki, takie jak np. grupa karboksylowa. Ze względu na dużą różnorodność strukturalną, klasyfikacja omawianych związków jest trudna. Biorąc pod uwagę budowę szkieletu węglowego, możemy wyróżnić następujące grupy związków:

- ✓ kwasy fenolowe ( $C_6 - C_1$ ),
- ✓ flawonoidy ( $C_6 - C_3 - C_6$ ),
- ✓ proantocyjanidyny ( $C_6 - C_3 - C_6$ )<sub>n</sub>,
- ✓ stilbeny ( $C_6 - C_2 - C_6$ ),
- ✓ lignany ( $C_6 - C_3$ )<sub>2</sub>,
- ✓ ligniny ( $C_6 - C_3$ )<sub>n</sub> [89-92].

### 2.2.1. Kwasy fenolowe

Kwasy fenolowe (nazywane również fenolokwasami) są to związki chemiczne zawierające w swojej budowie fenolową grupę hydroksylową oraz grupę karboksylową. Są to metabolity wtórne o zróżnicowanej budowie chemicznej i o zróżnicowanych właściwościach biologicznych. W zależności od liczby atomów węgla w łańcuchu bocznym wyróżnia się proste kwasy benzoowe, kwasy fenylooctowe oraz kwasy cynamonowe [93-95].



Rys.7. Podział i struktura kwasów fenolowych:  $R_1, R_2 - H, OCH_3, OH, R_2 - OH$  [93].

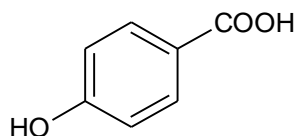
W przyrodzie kwasy fenolowe mogą występować w różnych formach, takich jak:

- ✓ wolne fenolokwasy,
- ✓ estry fenolokwasów (depsydy, depsydony),
- ✓ formy heterozydowe (proste, złożone) [96, 97].

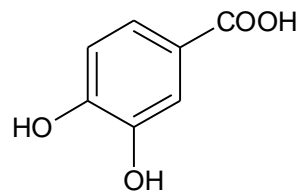
Powszechnie kwasy fenolowe możemy spotkać w surowcach roślinnych jako pochodne kwasu cynamonowego oraz pochodne kwasu benzoowego. Szczególnie rozpowszechnione są pochodne kwasu cynamonowego. Występują one zarówno w postaci wolnej, jak i depsydów, a także w połączeniach glikozydowych. Czasami również wchodzi one w skład cząsteczek antocyjanów lub flawonów [99-100].

Najpopularniejszymi pochodnymi kwasu benzoowego są kwasy protokatechinowy i p-hydroksybenzoowy. Kwasy te występują np. w czarnej porzeczce oraz w czerwonych owocach (truskawkach czy malinach). Do tej grupy zaliczamy również kwas galusowy, który jest silnym przeciwutleniaczem. Bogatym jego źródłem są m.in. herbaty czy truskawki. W grupie pochodnych kwasu cynamonowego popularnym przykładem jest kwas kawowy, występujący m.in. w jabłkach, gruszkach czy śliwkach, który charakteryzuje się bardzo dużą aktywnością przeciwutleniającą. Innymi przykładami mogą być: kwas ferulowy (występujący np. w nasionach pszenicy, jęczmienia i owsa), kwas p-kumarowy (występujący w owocach, np. w jabłkach czy w czarnej porzeczce) oraz kwas synapinowy (występujący w warzywach, np. w brokułach) [101-103].

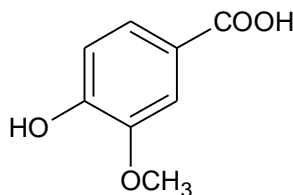
Poniżej przedstawiono wzory najważniejszych i najpopularniejszych kwasów fenolowych.



kwas p-hydroksybenzoesowy



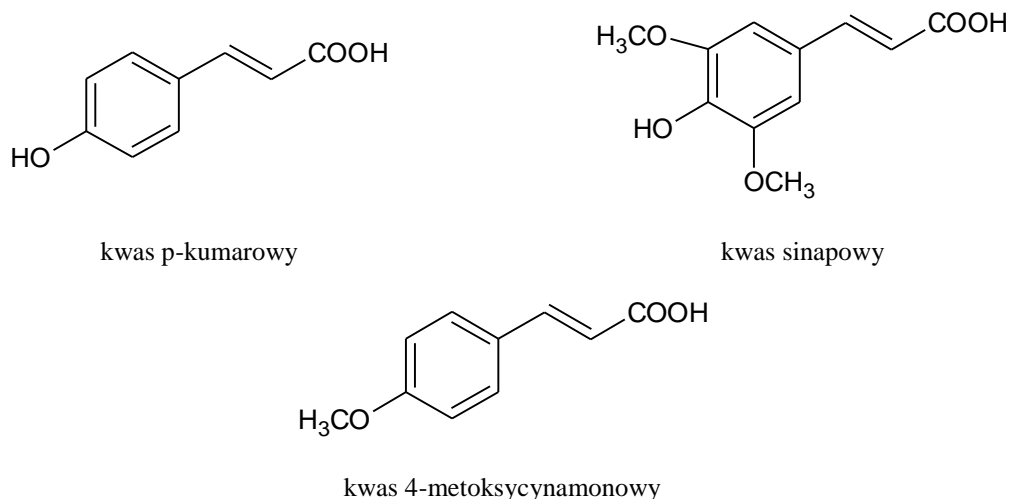
kwas protokatechowy



kwas wanilinowy

Rys.8. Wybrane pochodne kwasu benzoowego [104].





Rys.9. Wybrane pochodne kwasu cynamonowego [104].

W syntezie kwasów fenolowych podstawowym prekursorem jest fenyloalanina. W wyniku deaminacji fenyloalaniny powstaje kwas cynamonowy oraz inne jego hydrokysypochodne o charakterze kwasów fenolowych. Powstające w ten sposób niektóre kwasy fenolowe odgrywają rolę prekursorów w biosyntezie kwasu galusowego oraz garbników hydrolizujących. Reakcja odszczepienia grupy aminowej od fenyloalaniny przez enzym o nazwie amoniakaliza fenyloalaniny jest bardzo ważnym etapem syntezy związków fenolowych. W jej wyniku zostaje utworzony kwas cynamonowy, który jest substratem zarówno do syntezy innych prostych związków, jak i związków złożonych. Kwas cynamonowy i wiele związków, które są jego pochodnymi określa się mianem fenylopropanoidów, ze względu na trójwęglowy łańcuch połączony z rdzeniem aromatycznym. Związki te przekształcane są często w pochodne, np. kwas salicylowy i inne, nie mające już bocznego łańcucha trójwęglowego [105-107].

Kwasy fenolowe, zarówno pochodne kwasu cynamonowego, jak i pochodne kwasu benzoowego, są bardzo rozpowszechnione w świecie roślin. Występują one m.in. w liściach szalwii, melisy czy rozmarynu. Prawdopodobnie kwasy fenolowe występują jako substancje wypełniające zdrewniałe części roślin, tzn. ligniny, z którymi są powiązane estrowo. Pełnią one w tym przypadku rolę inhibitorów celulaz wytwarzanych przez patogeny i w ten sposób hamują ich wnikanie przez błony do wnętrza komórki [108-110].

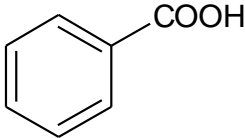
Tab.3. Średnia zawartość kwasów fenolowych w wybranych produktach spożywczych pochodzenia roślinnego [111].

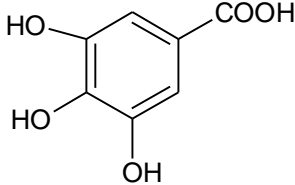
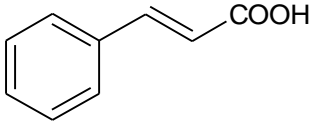
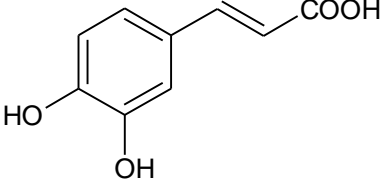
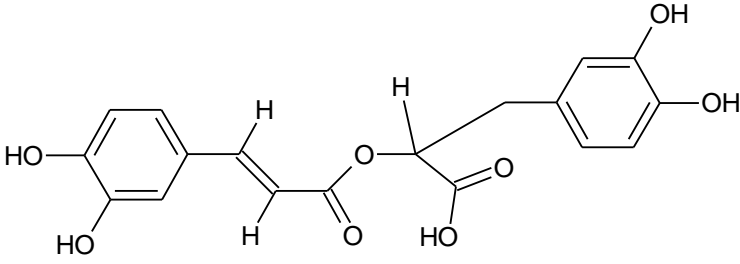
Produkt	Zawartość kwasów fenolowych	
	Rodzaj kwasu	Zawartość mg/kg suchej masy
jabłko	chlorogenowy	200
truskawka	galusowy	120
	wanilinowy	25
agrest	kawowy	10
	ferulowy	10
sałata	cykoriowy	100
	kawoilojabłkowy	30
surowe ziarno kawy	chlorogenowy	60000
	dikawoilochinowy	10000

W organizmie ludzkim kwasy fenolowe wykazują zróżnicowaną aktywność biologiczną. Do najważniejszych właściwości farmakologicznych należą:

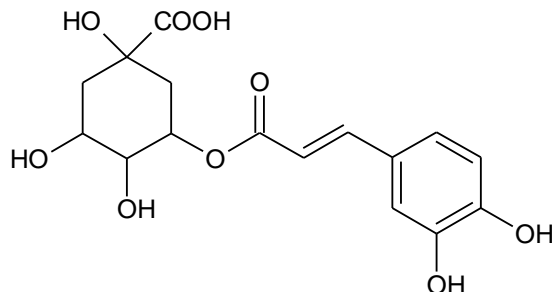
- ✓ antyoksydacyjne [112, 113],
- ✓ przeciwbakteryjne [114, 115],
- ✓ przeciwzapalne [116, 117],
- ✓ przeciwnowotworowe [118, 119].

Tab.4. Krótki opis wybranych kwasów fenolowych.

Nazwa	Struktura i opis	Właściwości farmakologiczne
kwask benzoowy	 <p>Kwas benzoowy występuje w postaci białych, błyszczących kryształów o temperaturze topnienia 120°C. Występuje w wielu owocach w ilości rzędu 0,05%.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ przeciwbakteryjne,</li> <li>✓ przeciwgrzybicze,</li> <li>✓ wykrztuśne [120, 121].</li> </ul>

<p>kwas galusowy</p>	 <p>Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne (kompleksowania metali, tworzenia estrów) jest prekursorem wielu związków biologicznie czynnych.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ przeciwnowotworowe,</li> <li>✓ przeciwzapalne,</li> <li>✓ hamuje degradację insuliny [122, 123].</li> </ul>
<p>kwas cynamonowy</p>	 <p>Kwas cynamonowy występuje w dwóch odmianach izomerycznych: <i>cis</i> i <i>trans</i>. Jest składnikiem balsamu peruwiańskiego, czyli naturalnego leku wyciekającego z uszkodzonej kory drzewa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ przeciwcukrzycowe,</li> <li>✓ substancja zapachowa [124, 125].</li> </ul>
<p>kwas kawowy</p>	 <p>Spotykany jest najczęściej w roślinach z rodzin: jasnotowatych (<i>Lamiaceae</i>) oraz astrowatych (<i>Asteraceae</i>). Jest podstawowym składnikiem roślinnych metabolitów wtórnych o budowie estrowej.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ przeciwbakteryjne,</li> <li>✓ przeciwgrzybicze,</li> <li>✓ antyoksydacyjne [126, 127].</li> </ul>
<p>kwas rozmarynowy</p>	 <p>Jest to ester kwasu kawowego i <math>\alpha</math>-hydroksydihydrokawowego. Wolny kwas rozmarynowy występuje w ponad stu gatunkach roślin w ilościach od 0,01 mg do 78 mg w 1 g surowca.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ przeciwzapalne,</li> <li>✓ przeciwbakteryjne,</li> <li>✓ przeciwwirusowe,</li> <li>✓ przeciwalergiczne [128-130].</li> </ul>

kwask  
chlorogenowy



Jest estrem (depsydem) kwasu kawowego z kwasem chinowym. Występuje w wielu surowcach roślinnych, np. w kawie, herbacie, pomidorach czy brzoskwiniaach.

- ✓ reguluje metabolizm glukozy i lipidów,
- ✓ przeciwzapalne,
- ✓ przeciwbakteryjne,
- ✓ antyoksydacyjne [131, 132].

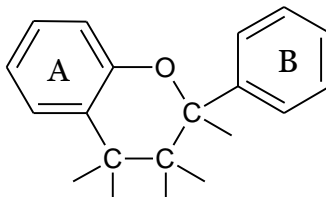
Metodyka izolacji kwasów fenolowych w znacznej mierze zależy od rodzaju badanej próbki. Związki te możemy izolować z próbek stałych (surowce roślinne, stałe postacie leku ziołowego) oraz z próbek ciekłych (soków owocowych, płynów ustrojowych, czy płynnych postaci leku) [133]. Poniżej wymieniono najważniejsze metody izolacji:

- ✓ ekstrakcja prosta [134],
- ✓ ekstrakcja połączona z hydrolizą [135],
- ✓ ekstrakcja przy użyciu aparatu Soxhleta [136],
- ✓ ekstrakcja przy pomocy rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami (UAE) [137],
- ✓ ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE) [138],
- ✓ przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikowa (ASE) [139],
- ✓ ekstrakcja wodą w stanie nadkrytycznym [140],
- ✓ ekstrakcja rozpuszczalnikiem z próbki zmieszanej wypełniaczem (MSPD) [141].

Stężenie związków fenolowych, w tym kwasów fenolowych, w ekstraktach otrzymanych z materiału roślinnego zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj próbki, czas i temperatura prowadzenia ekstrakcji oraz polarność wykorzystanego rozpuszczalnika. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami w ekstrakcji materiału roślinnego są woda, metanol lub etanol. Separacja kwasów fenolowych z ekstraktów jest bardzo skomplikowana i czasochłonna, dlatego koniecznym stało się opracowanie szybkiego i skutecznego sposobu rozdzielania i oczyszczania kwasów fenolowych [142, 143].

### 2.2.2. Flawonoidy

Flawonoidy jest to jedna z największych grup metabolitów wtórnych, które pełnią zróżnicowane funkcje biologiczne w roślinach. Ich działanie jest zależne od struktury. Natura chemiczna flawonoidów zależy od stopnia hydroksylacji, charakteru podstawników i stopnia polimeryzacji. Są to pochodne chromonu (benzo- $\gamma$ -pironu) o różnorodnych barwach, rozpuszczone w soku komórkowym różnych organów roślinnych. Ich podstawowym elementem strukturalnym jest piętnastowęglowy szkielet zbudowany z dwóch pierścieni benzenowych połączonych łańcuchem propanowym tworzący układ  $C_6-C_3-C_6$ . W większości przypadków połączenie trójwęglowym mostkiem propanowym przekształca się w układ zamknięty w postaci pierścienia zawierającego heteroatom tlenu. Zidentyfikowano już ponad 4000 różnych flawonoidów, z których wiele jest odpowiedzialnych za atrakcyjny kolor kwiatów, owoców i liści [144-147].



Rys.10. Podstawowa struktura flawonoidów [148].

Głównym źródłem flawonoidów w diecie człowieka są warzywa i owoce. Średnie spożycie tych związków chemicznych dla mieszkańca Europy wynosi 20 mg dziennie. W dużych ilościach flawonoidy występują w zielonej i czarnej herbacie, w czerwonym winie, w cebuli, jabłkach, owocach cytrusowych i gryce. Stwierdzono zależność między stosowaniem diety bogatej we flawonoidy i zmniejszoną zachorowalnością, np. na choroby krążenia i nowotwory. Flawonoidy należą do grupy związków rzadko spotykanych wśród bakterii, glonów, porostów i mszaków. U mszaków i paprotników zostały zidentyfikowane głównie jako glikozydy flawonów i pochodne o-uronowe. Powszechne występowanie flawonoidów rozpoczyna się w układzie systematycznym u roślin naczyniowych od klasy paproci. Właśnie w tej klasie roślin wyróżniono takie związki flawonoidowe jak O-glikozydy flawonoli, C-metyloflawonoidy, chalkony czy proantocyjaniny. U roślin dwuliściennych flawonoidy występują szczególnie powszechnie w takich rodzinach, jak np.:

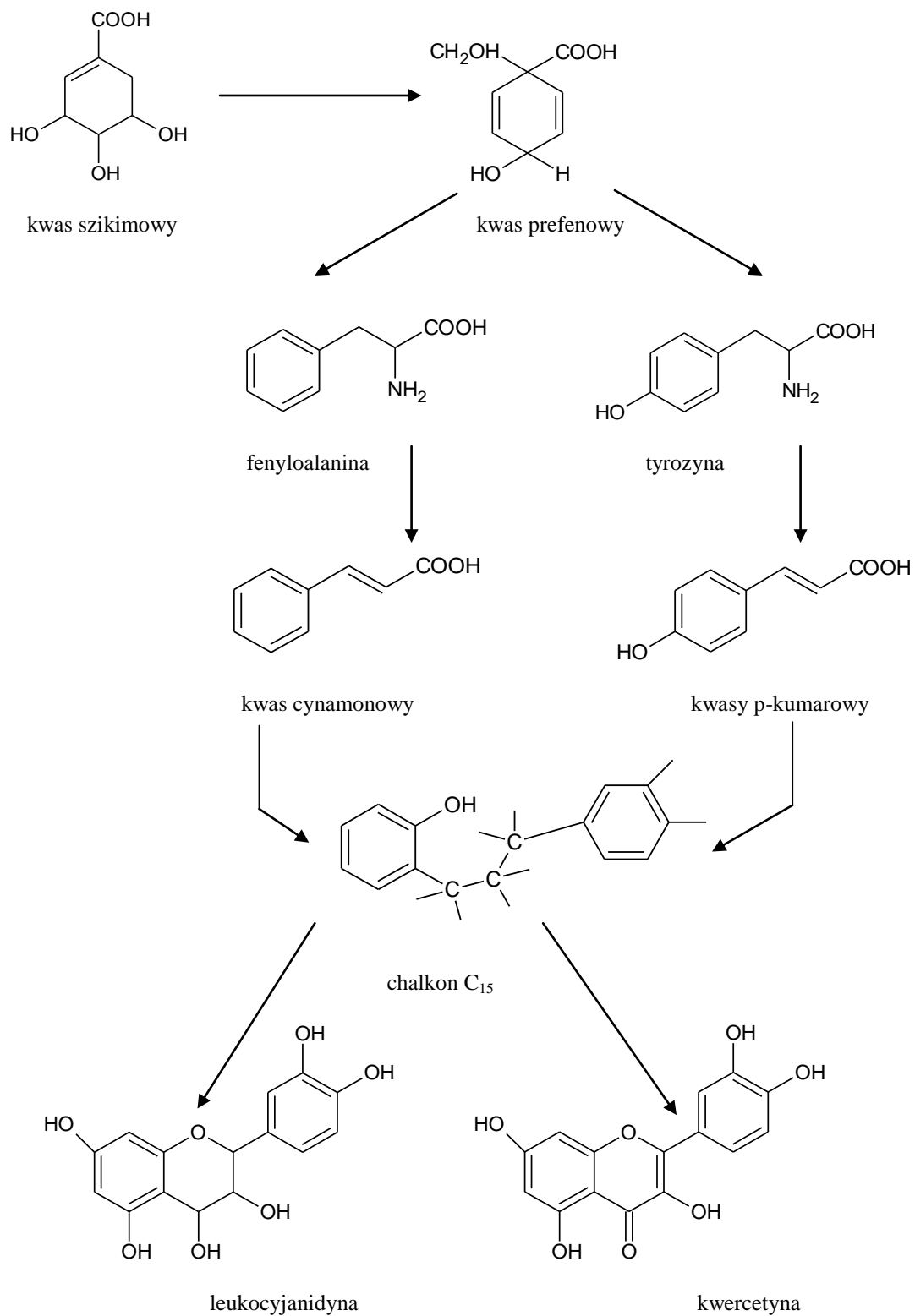
- ✓ brzoźowate (*Betulaceae*),
- ✓ rdestowate (*Polygonaceae*),
- ✓ wrzosowate (*Ericaceae*),
- ✓ wargowe (*Lamiaceae*).

W rodzinie jednoliściennych flawonoidy również są spotykane, np. w rodzinie liliowatych (*Liliaceae*) [149-151].

Tab.5. Występowanie flawonoidów w pożywieniu [152].

Podklasa flawonoidów	Główne źródło w żywności
flawonole	cebula, kapusta, brokuły, jabłka, jagody, wiśnie
flawony	pietruszka, tymianek
flawanony	owoce cytrusowe
katechiny	jabłka, herbata
antocyjanidyny	wiśnie, winogrona
izoflawony	soja, rośliny strączkowe

Biosynteza związków flawonoidowych jest procesem złożonym. Pochodzenie podstawowych struktur flawonoidowych jest mieszane: układ C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> cząsteczki wywodzi się z aminokwasów aromatycznych bezpośrednio od kwasu cynamonowego, natomiast pierścień fenyłowy B bierze początek od octanu, który włącza się do niego w drodze poliketydowej. Układ ten jest wynikiem aktywności enzymatycznej dwóch różnych szlaków metabolicznych: szlaku kwasu szikimowego oraz szlaku kwasu malonowego. Produktem pośrednim omawianej biosyntezy jest odpowiedni chalkon. Cyklizacja kwasu cynamonowego (lub p-kumarowego) do chalkonu zachodzi przy współudziale dwóch cząsteczek malonylo-koenzymu A. Z produktu pośredniego, który jest nietrwały, tj. chalkonu, powstaje układ flawonu i jego wszystkie możliwe modyfikacje (rys.11.). Izoflawony powstają z tych samych prekursorów, jedynie podczas biosyntezy następuje migracja aryłu [153-156].



Rys.11. Biosynteza flawonoidów [157].

Flawonoidy, w zależności od postaci w jakiej występują, wykazują różną rozpuszczalność:

- ✓ w postaci glikozydów są rozpuszczalne w wodzie i alkoholu etylowym, natomiast nie rozpuszczają się w eterze, chloroformie i benzenie,
- ✓ w postaci aglikonów nie rozpuszczają się w wodzie, ale rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych.

Wspólną właściwością dla obu form flawonoidów jest rozpuszczalność w alkaliach. Charakterystyczną właściwością związków flawonoidowych jest ich fluorescencja w świetle UV. Pod wpływem niektórych odczynników zasadowych fluorescencja żółta pogłębia się, a brunatna zmienia się na żółtą. Szczególnie dogodne jest stosowanie par amoniaku. Bardzo ważne są również reakcje z solami metali polegające na tworzeniu kompleksów chelatowych. W czasie tworzenia się kompleksu jon metalu i atomy grup podstawnikowych zamykają jeden pierścień albo kilka pierścieni chelatowych. Pochodne hydroksylowe flawonów i flawanonów mają trzy możliwości kompleksowania jonów metali [158-160].

Flawonoidy wykazują zróżnicowane działanie farmakologiczne, między innymi wykazują właściwości:

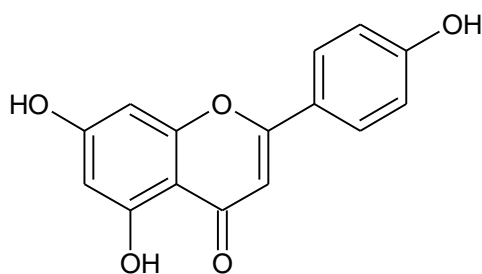
- ✓ antyoksydacyjne [161, 162],
- ✓ przeciwzapalne [163, 164],
- ✓ ochraniające wątrobę [165, 166],
- ✓ przeciwgrzybicze [167, 168],
- ✓ przeciwbakteryjne [169, 170],
- ✓ przeciwnowotworowe [171, 172],
- ✓ przeciwwirusowe [173, 174],
- ✓ opóźniają rozwój miażdżycy [175, 176],
- ✓ moczopędne [177, 178].

Flawonoidy stanowią rodzinę związków różniących się między sobą liczbą i umiejscowieniem grup hydroksylowych przy obu pierścieniach, różnym stopniem utlenienia łącznika trójwęglowego  $-C_3$ , typem połączenia glikozydowego z cukrami prostymi, kwasami cukrowymi i innymi kwasami organicznymi oraz występowaniem układów dimerycznych, tj. powtarzaniem się struktury wymienionego piętnastowęglowego szkieletu (tzw. biflawonoidy). Ze względu na budowę chemiczną flawonoidy dzielimy na:

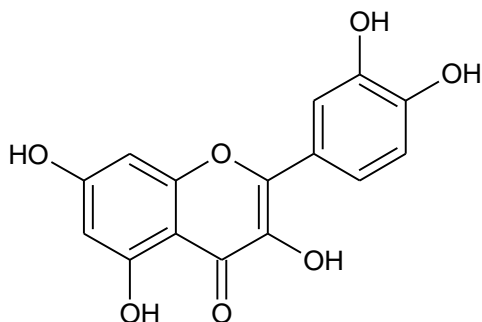


- ✓ flawony i ich dimery,
- ✓ flawonole i ich dimery - posiadające grupę hydroksylową,
- ✓ flawanony - posiadające wiązanie nasycone,
- ✓ dihydroflawonole - posiadające zarówno grupę hydroksylową jak i wiązanie nasycone,
- ✓ izoflawony,
- ✓ izoflawonony - posiadające wiązanie nasycone,
- ✓ chalkony i dihydrochalkony,
- ✓ aurony.

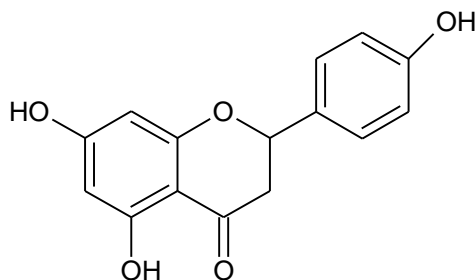
Bardzo często do flawonoidów zaliczamy również antocyjany posiadające pierścień 2-fenylobenzopiryliowy oraz pochodne 2-fenylochromonu, tj. flawany, flawon-3-ole oraz flawon-3,4-diole. Do związków odpowiadających strukturze piętnastowęglowej, czyli do związków flawonoidowych, zaliczamy również leukoantocyjanidyny oraz katechiny [179-184].



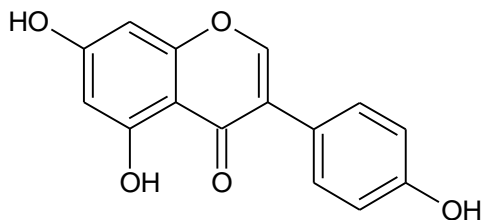
apigenina (flawon)



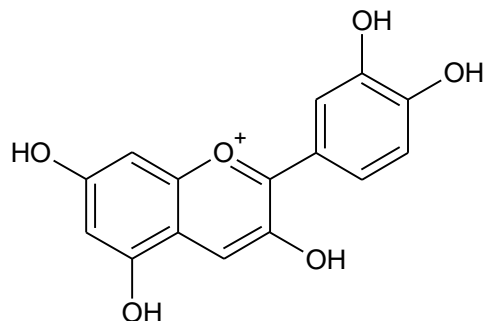
kwercecyzna (flawonol)



naryngenina (flawanon)



genisteina (izoflawon)



cyjanidyna (antocyjan)

Rys.12. Wzory strukturalne wybranych flawonoidów [185, 186].

Ekstrakcję flawonoidów możemy przeprowadzić z próbek stałych takich jak, np. surowce roślinne, stałe postacie preparatów ziołowych oraz z próbek ciekłych, np. z płynnych postaci leków, napojów czy płynów ustrojowych. Izolacji flawonoidów z próbek stałych dokonuje się stosując następujące metody [187]:

- ✓ ekstrakcję w aparacie Soxhleta [188],
- ✓ ekstrakcję rozpuszczalnikiem wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE) [189],
- ✓ ekstrakcję rozpuszczalnikiem wspomaganą ultradźwiękami (UAE) [190],
- ✓ ekstrakcję rozpuszczalnikiem z próbki zmieszanej wypełniaczem (MSPD) [191],
- ✓ ekstrakcję płynu w stanie nadkrytycznym (SFE) [192].

Do ekstrakcji flawonoidów z cieczy, jak też do dalszego oczyszczania i frakcjonowania ekstraktów płynnych otrzymanych wcześniej wymienionymi metodami, stosuje się następujące sposoby:

- ✓ ekstrakcję do fazy stałej (SPE) [193],
- ✓ mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) [194],
- ✓ preparatywną chromatografię kolumnową [195].

### **3. Opis wybranych właściwości biologicznych roślin**

#### **3.1. Właściwości przeciwutleniające**

W większości przypadków choroby cywilizacyjne są spowodowane takimi czynnikami jak: zanieczyszczenie środowiska naturalnego i żywności, niewłaściwy sposób odżywiania się oraz stres związany z rosnącym tempem życia codziennego. Wymienione czynniki, które najczęściej występują w kombinacji ze sobą, stwarzają większe bądź mniejsze zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Medycyna współczesna stara się radzić sobie z powstającymi schorzeniami często stosując terapie z wykorzystaniem leków. Głównym problemem związanym z wykorzystaniem substancji syntetycznych jest jednak fakt, iż wiele z nich leczy tylko objawy, a nie przyczyny powstawania chorób. Dodatkowo ich stosowanie w chorobach przewlekłych wiąże się z ryzykiem wystąpienia negatywnych efektów ubocznych. Wydaje się więc, że odpowiednia profilaktyka, z którą w dużym stopniu wiąże się odżywianie, może spowodować zmniejszenie rozwoju chorób cywilizacyjnych. Rozwiązaniem może tu być odpowiednia dieta, obfita w substancje i składniki pochodzenia naturalnego, które posiadają pozytywny wpływ na organizm człowieka. Do takich substancji należą między innymi przeciwutleniacze, inaczej antyoksydanty, które w ostatnich latach stały się bardzo popularnym obiektem badań naukowych [196-199].

Wolne rodniki to atomy, cząsteczki lub jony posiadające w swojej budowie niesparowane elektrony, przez co są nietrwałe i łatwo ulegają reakcjom chemicznym z innymi cząsteczkami. Mogą to być pochodne tlenu, azotu lub siarki, w ten sposób tworząc odpowiednio reaktywne formy tlenu (ROS), reaktywne formy azotu (RNS) oraz reaktywne formy siarki (RSS). Do reaktywnych form tlenu i azotu możemy zaliczyć takie wolne rodniki jak:

- ✓ rodnik ponadtlenkowy,
- ✓ rodnik hydroksylowy,
- ✓ rodnik wodoronadtlenkowy,
- ✓ monotlenek azotu,
- ✓ rodnik alkoksylowy,
- ✓ rodnik nadnitrylowy [200-203].

W zdrowym organizmie człowieka wolne rodniki tworzą się w procesie utleniania w łańcuchu oddechowym w mitochondriach, w reakcjach katalizowanych przez różne oksydanty, w procesie fagocytozy, w przemianach kwasu arachidowego w płytkach krwi czy też w autooksydacji związków biologicznie czynnych. Ich poziom jest ściśle kontrolowany w danym organizmie. Wolne rodniki ze względu na swoją dużą aktywność reagują ze sobą lub z najbliższym otoczeniem. Przyczynami ich powstawania mogą być również czynniki zewnętrzne, takie jak palenie tytoniu, zanieczyszczone środowisko, substancje chemiczne, nadużywanie alkoholu, jak również czynniki fizyczne (ultradźwięki, promieniowanie jonizujące i promieniowanie ultrafioletowe). W normalnych okolicznościach, gdy procesy zachodzą w zdrowych komórkach, tworzy się równowaga między produkcją wolnych rodników tlenowych a systemem obronnym, usuwającym reaktywne produkty pośrednie. Kiedy jednak homeostaza jest zaburzona, następuje nadmierne ich gromadzenie. Dochodzi wtedy do zjawiska, które jest definiowane jako stres oksydacyjny, będący przyczyną takich chorób jak np. nowotwory, miażdżyca, cukrzyca czy schorzenia reumatyczne. Organem szczególnie narażonym na uszkodzenia wywołane stresem oksydacyjnym jest mózg, co może skutkować między innymi chorobą Alzheimera [204-209].

Według Halliwell'a i Gutteridge'a [210] przeciwutleniacze możemy zdefiniować jako substancje występujące w niewielkim stężeniu w porównaniu z utleniającym się substratem, które znacznie opóźniają lub zapobiegają jego utlenieniu. Później jednak ci sami autorzy uzupełnili tę definicję [211] określając przeciwutleniacze jako dowolne substancje, które opóźniają, zapobiegają lub usuwają uszkodzenia spowodowane utlenianiem docelowych cząsteczek. W tym samym roku Khlebnikov [212] zdefiniował przeciwutleniacze jako substancje, które bezpośrednio wymiatają reaktywne formy tlenu lub pośrednio działają regulująco na obronę przeciwutleniającą lub hamują produkcję reaktywnych form tlenu. Inną właściwością, jaką powinien posiadać związek określany jako przeciwutleniacz, jest zdolność, po wychwyceniu rodników, do tworzenia nowych rodników, które są stabilne i odporne na dalsze utlenianie. Antyoksydacyjny system ochronny można podzielić na trzy kategorie:

- ✓ przeciwutleniacze prewencyjne: powstrzymują tworzenie się reaktywnych form tlenu (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, albuminy czy karotenoidy),
- ✓ zmiatacze wolnych rodników: przerywają rozwój reakcji łańcuchowej (bilirubina, kwas moczowy czy witaminy A, C i E),
- ✓ enzymy reparacyjne: usuwają skutki reakcji reaktywnych form tlenu z biomolekułami i odtwarzają błony (enzymy naprawcze DNA, lipaza czy transferaza) [210-215].

Najbardziej rozpowszechniony i ogólnie przyjęty podział antyoksydantów to podział uwzględniający ich charakter biochemiczny. Zgodnie z nim wyróżniamy dwie grupy: przeciwutleniacze enzymatyczne i nieenzymatyczne. Do pierwszej kategorii możemy zaliczyć takie związki jak dysmutaza nadtlenkowa czy katalaza, natomiast do grupy drugiej - kwas askorbinowy (witamina C),  $\alpha$ - tokoferol (witamina E) i  $\beta$ -karoten (witamina A). Antyoksydanty możemy również podzielić pod kątem ich pochodzenia:

- ✓ syntetyczne - są związkami ze strukturą fenolową, z różnymi podstawnikami alkilowymi. Popularnymi związkami należącymi do tej grupy są:
  - butylohydroksyanizol (BHA),
  - butylohydroksytoluen (BHT),
  - tert-butylohydrochinon (TBHQ).
- ✓ naturalne - mogą być związkami fenolowymi, związkami azotowymi lub karotenoidami. Naturalne antyoksydanty występują przede wszystkim w jadalnych częściach roślin: w owocach i liściach, a także w bulwach, korzeniach czy nasionach. Możemy je podzielić na następujące grupy:
  - polifenole (flawonoidy, kwasy fenolowe, stilbeny),
  - tokoferole,
  - sterole,
  - karotenoidy,
  - kwas askorbinowy.

W ostatnich latach pojawiło się wiele pytań dotyczących bezpieczeństwa związanego ze stosowaniem sztucznych antyoksydantów. Prowadzone badania wykazały, że syntetyczne antyoksydanty mogą być toksyczne dla organizmu ludzkiego, co spowodowało aktualny wzrost zainteresowania przeciwutleniaczami naturalnymi [216-224].

Istnieje wiele metod chemicznych, dzięki którym można zbadać zdolność antyoksydacyjną wybranego materiału badawczego. Różnorodność metod wynika z odmiennej budowy, funkcji czy pochodzenia utleniaczy i reaktywnych form tlenu. Wszystkie metody służące do oceny przeciwutleniaczy, zarówno ich ilości, jak i aktywności, możemy podzielić na:

- ✓ chromatograficzne (TLC, GC oraz HPLC),
- ✓ spektrofotometryczne,
- ✓ kolorymetryczne,
- ✓ elektrochemiczne (woltamperometria cykliczna, spektroelektrochemia),
- ✓ EPR [225-228].

Biorąc pod uwagę, iż w badaniach wykorzystywana jest zdolność antyoksydantów do dezaktywacji wolnych rodników, reakcje mogą przebiegać według dwóch mechanizmów:

- ✓ mechanizmu przeniesienia atomu wodoru, czyli tzw. mechanizmu HAT (ang. Hydrogen Atom Transfer),
- ✓ mechanizmu przeniesienia pojedynczego elektronu, czyli tzw. mechanizmu SET (ang. Single Electron Transfer) [229-231].

Do najpopularniejszych metod wyznaczania zdolności antyoksydacyjnych związków chemicznych należą:

- ✓ metoda Folina-Ciocalteu'a, dotycząca flawonoidów; polega ona na tworzeniu przez flawonoidy zielono-niebieskiego kompleksu z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a (mieszanina wolframianu sodu, molibdenianu sodu, wody bromowej i siarczanu litu w środowisku kwasu fosforowego i solnego). Po utlenieniu stężenie kompleksu oznaczane jest spektrofotometrycznie przy długości fali od 750 do 784 nm [232, 233],
- ✓ metody oparte na reakcjach wygaszania syntetycznych wolnych rodników (ABTS, DPPH); antyoksydanty obecne w badanej próbce przyczyniają się do redukcji barwnego, aktywnego rodnika, co ilościowo oznacza się spektrofotometrycznie przy długości fali 734 i 515 nm odpowiednio dla DPPH [234, 235] i ABTS [226, 237],
- ✓ metoda FRAP, polega ona na określeniu zdolności danego układu do redukcji jonów  $\text{Fe}^{3+}$  do jonów  $\text{Fe}^{2+}$ , które są z kolei kompleksowane przez TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyn) z wytworzeniem intensywnego, niebieskiego zabarwienia o maksimum absorpcji przy długości fali 593 nm [238, 239],
- ✓ metoda TRAP, metoda ta opiera się na pomiarze spadku fluorescencji białka R-fikoerytryny (R-PE), spowodowanego przez rodniki nadtlenkowe produkowane na drodze termicznego rozkładu związku azowego AAPH. Długość fali wzbudzającej to 540 nm, a emisji 570 nm [240, 241],

- ✓ metoda CUPRAC, w której jony  $\text{Cu}^{2+}$  ulegają redukcji do jonów  $\text{Cu}^+$  pod wpływem antyoksydantów. Analizę spektrofotometryczną wykonuje się przy długości fali 450 nm [242, 243],
- ✓ metoda ORAC, polega ona na pomiarze spadku fluorescencji tzw. sondy molekularnej, spowodowanego uszkodzeniem chemicznym, wywołanym działaniem wolnych rodników [244, 245].

### 3.2. Właściwości przeciwbakteryjne

Badania dotyczące właściwości biologicznych analizowanych związków w określonym materiale to bardzo ważne zagadnienie we współczesnej farmakognozji. Nowoczesne metody analityczne, dzięki którym możemy wykonać analizę jednocześnie nawet kilkuset związków, w połączeniu z metodami spektroskopowymi mogą dostarczyć informacji o strukturze rozdzielonych związków, jednak nie dostarczają informacji o ich aktywności biologicznej. Testy aktywności biologicznej nie posiadają dużej zdolności rozdzielczej w porównaniu z innymi metodami, ale dzięki nim możemy wykryć substancje, które są biologicznie czynne i mogą być potencjalnym zagrożeniem dla człowieka. Testy aktywności biologicznej możemy zaliczyć do tzw. metod ukierunkowanych na efekt (EDA, effect - directed analysis). Metody te mają zwykle charakter przesiewowy (lub skринingowy) i często wymagają potwierdzenia oraz dalszej, dokładniejszej analizy. Są one jednak bardzo ważne, gdyż bez nich nie wiedzielibyśmy o istnieniu poszczególnych substancji, poddawanych dalszym badaniom. Do najpopularniejszych testów aktywności biologicznej należą:

- ✓ testy genotoksyczności oraz mutacji powrotnych bakterii,
- ✓ test Yes dla oznaczania związków o aktywności estrogennej,
- ✓ testy enzymatyczne,
- ✓ testy mikrobiologiczne klasyczne,
- ✓ testy bioautograficzne [246-250].

Bioautografia należy do metod przesiewowych (skринingowych), która łączy chromatografię planarną z detekcją mikrobiologiczną. Dzięki niej możemy wykryć substancje (przeciwbakteryjne, przeciugrzybicze oraz przeciwnowotworowe) wpływające na szybkość wzrostu organizmów testowych w złożonych mieszaninach [251-253].

W przypadku chromatografii cienkowarstwowej procedura wygląda następująco:

- ✓ rozwinięcie płytki chromatograficznej,
- ✓ pokrycie agarem (lub pożywką z posiewem bakteryjnym) rozwiniętej płytki chromatograficznej,
- ✓ inkubacja i wybarwianie płytki,
- ✓ obserwacja stref zahamowania wzrostu bakterii.



Do najczęściej stosowanych szczepów bakterii należą:

- ✓ *Micrococcus luteus*,
- ✓ *Staphylococcus aureus*,
- ✓ *Bacillus cereus*,
- ✓ *Bacillus subtilis*,
- ✓ *Escherichia coli* [254-259].

Metoda, która łączy TLC z bioautografią (TLC-B), w odróżnieniu od klasycznych metod mikrobiologicznych, jest czuła i selektywna. Po raz pierwszy bioautografia w tzw. wersji kontaktowej została zastosowana w 1946 roku przez Goodalla i Leviego [260]. Wykorzystano ją do oznaczenia czystości penicyliny. Kilkanaście lat później powstała chromatografia cienkowarstwowa z detekcją mikrobiologiczną (bioautografia). Późniejsze prace przeglądowe opisują już tzw. bioautografię bezpośrednią (TLC - DB) [261, 262]. Do głównych zadań bioautografii należą:

- ✓ wykrywanie i oznaczanie substancji aktywnych biologicznie w próbkach środowiskowych,
- ✓ kontrola jakości preparatów farmaceutycznych,
- ✓ poszukiwanie nowych substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych czy przeciwnowotworowych [263].

Metody bioautograficzne możemy podzielić na:

- ✓ bioautografię kontaktową (tzw. „agar diffusion”); w tej metodzie rozwiniętą płytkę chromatograficzną z rozdzielonymi, pojedynczymi substancjami lub frakcjami substancji umieszczamy w cienkiej warstwie skierowanej w stronę pożywki na kilka minut lub godzin. Po upływie tego czasu płytkę usuwamy a agar poddajemy inkubacji. Strefy zahamowania wzrostu bakterii obserwujemy w miejscu, w którym plamki substancji stykały się z agarem (metoda przypomina klasyczny mikrobiologiczny dyfuzyjny test dyskowy) [264, 265],
- ✓ bioautografię zanurzeniową (tzw. „agar-overlay”); w metodzie tej chromatogram pokrywamy półpłynnym agarem. Po stwardnieniu, inkubacji i wybarwieniu (zazwyczaj stosujemy barwnik tetrazoliowy), mierzymy strefy zahamowania wzrostu. Technika ta jest hybrydą bioautografii kontaktowej i bezpośredniej. Substancje dyfundują z płytki TLC na pożywkę agarową, tak jak w metodzie kontaktowej, ale podczas inkubacji i wizualizacji warstwa agarowa pozostaje na płytce, tak jak w bioautografii bezpośredniej [266, 267],

- ✓ bioautografię bezpośrednią (direct bioautography); w metodzie tej rozwiniętą płytkę chromatograficzną zanurzamy lub spryskujemy zawiesiną z mikroorganizmami rosnącymi na odpowiedniej pożywce. Płytkę następnie inkubujemy, a wykorzystane bakterie rosną bezpośrednio na niej. Wobec tego rozdzielanie, kondycjonowanie, inkubację i wizualizację wykonujemy wprost na płytce. Dla lokalizacji i wizualizacji substancji używamy zazwyczaj soli tetrazoliowych np. MTT, które przekształcane są przez dehydrogenazy żywych mikroorganizmów w intensywnie zabarwiony formazan. Strefy zahamowania wzrostu występują w postaci białych, niewybarwionych plam na fioletowym tle [268, 269].

Bioautografia ilościowa oparta jest na analizie metodą regresji liniowej rozmiarów strefy zahamowania wzrostu bakterii. Zależność pomiędzy średnicą powierzchni strefy zahamowania wzrostu a logarytmem stężenia zastosowanych substancji jest liniowa. Udowodniono, że przybliżenie to jest możliwe tylko dla wąskiego zakresu stężeń (jeden lub dwa rzędy wielkości). Dla szerszego zakresu stężenia zależność wykładnicza jest lepsza od liniowej [270-272].

W jednej z odmian bioautografii bezpośredniej wykorzystuje się zjawisko luminescencji niektórych bakterii i związków chemicznych. Do stosowanych w tej metodzie związków chemicznych można zaliczyć lucyferynę (pigment zdolny do emitowania światła na skutek reakcji utleniania lucyferazą), a do najbardziej znanych bakterii luminescencyjnych należą: *Vibrio phosphoreum*, *Vibrio fischeri harveyi* oraz *Photobacterium luciferum*, które swoją budową i fizjologią przypominają bakterie znajdujące się we florze jelitowej. Właściwości luminescencyjne bakterii *Vibrio fischeri* wykorzystano w analizie chemicznej i biochemicznej. Dla uzyskania pełnej informacji o poszczególnych składnikach konieczne jest zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej (TLC lub HPTLC) z detekcją bioluminescencyjną [273-276].

Chromatografia cienkowarstwowa w połączeniu z biologicznymi i chemicznymi metodami detekcji jest skuteczną i taną techniką analizy ekstraktów roślinnych, która charakteryzuje się niedużym zużyciem często kosztownych odczynników. W związku z tym, badania te mogą być wykonywane zarówno w małych, jak i w dużych laboratoriach chemicznych [277].

### 3.3. Właściwości przeciwnowotworowe

Aktualnie nowotwory są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów ludzi w Polsce i na świecie. W ciągu ostatnich 20 lat obserwujemy stały wzrost zachorowalności na raka, który w głównej mierze jest związany ze starzeniem się populacji ludzkiej. Pomimo licznych badań nad powodami powstawania, mechanizmami rozwoju oraz metodami walki z chorobami nowotworowymi, nadal nie znamy skutecznego sposobu postępowania, który gwarantowałby nam całkowite wyleczenie. Do wad konwencjonalnych strategii leczenia nowotworów możemy zaliczyć ich niską skuteczność, a także selektywność oraz częste remisje choroby po zakończeniu terapii. Niewielka ich efektywność to jedna z przyczyn poszukiwania alternatywnych sposobów terapii [278-280].

Mimowolnie jesteśmy narażeni na wchłanianie substancji kancerogennych. Związki te mogą pochodzić z powietrza (węglowodory aromatyczne, pyły czy spaliny), z żywności, jak i z wody (związki chloroorganiczne czy pestycydy). Tak duża obecność tych substancji w środowisku przyczynia się do wzrostu ryzyka chorób nowotworowych. Pod pojęciem chemioprewencji rozumiemy wszelkie zabiegi, niekoniecznie farmakologiczne, mające na celu zatrzymanie lub wręcz odwrócenie procesu nowotworzenia. Ponieważ preparaty chemioprewencyjne stanowią rzadkość na rynku farmaceutycznym, rośnie zainteresowanie naturalnymi sposobami zapobiegania. Niewłaściwa dieta może być przyczyną aż 50% wszystkich nowotworów, zajmując pierwsze miejsce na liście czynników wywołujących raka (nawet przed paleniem tytoniu - ok. 30% nowotworów). Dlatego bardzo ważne są nawyki żywieniowe, jakie wprowadzamy do naszej codziennej diety. Warzywa i owoce powinny stanowić podstawę żywienia człowieka. Aktualnie wykryto blisko 600 substancji o właściwościach przeciwnowotworowych w około 300 gatunkach roślin. Warto dodać, iż szacuje się, że może je zawierać nawet 2/3 roślin europejskich [281-285].

Oprócz substancji naturalnych działających bezpośrednio przeciwnowotworowo (kurkumina, kwas arystocholowy, kolchicina czy dafnoretyna) znamy obecnie także takie, które zapobiegają tworzeniu się zmian nowotworowych głównie poprzez pochłanianie i dezaktywację wolnych rodników i/lub poprzez wpływ na metabolizm potencjalnych kancerogenów na drodze inhibicji enzymów mikrosomalnych. Dotychczas opisano około setki związków wraz ze źródłowymi surowcami [286]. Do najważniejszych z nich należą:

- ✓ resweratrol - z chemicznego punktu widzenia jest to trihydroksypochodna trans-stilbenu, związku wykazującego konotacje farmakologiczne z estrogenami. Największa jego zawartość znajduje się w skórcie owoców winorośli (*Vitis vinifera*), stąd jego obecność w winie (szczególnie czerwonym). Resweratrol jest związkiem o silnych właściwości przeciwutleniających, dzięki czemu zapobiega odkładaniu się płytki miażdżycowej w naczyniach krwionośnych. Ponadto blokuje szereg enzymów, m.in. cyklooksygenazę 2. Jednak najbardziej interesującą właściwością tego związku chemicznego jest działanie antymutagenne poprzez ochronę kwasów nukleinowych przed niszczącym działaniem wolnych rodników tlenowych i utlenionych - w reakcjach metabolicznych I fazy- ksenobiotyków. Resweratrol w niedługim czasie może zostać uznany za cenny preparat ochraniający organizm przed ekspozycją na kancerogeny [287-289],
- ✓ polifenole występujące w zielonej herbacie - napar ze świeżych liści herbaty chińskiej jest skutecznym preparatem chemoprewencyjnym i antykancerogennym. Udowodniono, że blokuje on cytochrom P-450, a dodatkowo blokuje transkrypcję genu p53, co jest ważne w przypadku osobników ze zmutowaną postacią tego genu (chroni przed onkogenezą, szczególnie w komórkach skóry i jelita grubego). Prawdopodobnie związki chemiczne znajdujące się w liściach herbaty zapobiegają powstawaniu nowotworów prostaty [290-292],
- ✓ proste fenole i kwasy fenolowe - p-krezol (czarne jagody, maliny), wanilina (mąka popularnych zbóż), gallotaniny i kwasy galusowe (szereg surowców, np. kora dębu) - również wykazują właściwości antykancerogenne [293],
- ✓ flawonoidy - to obszerna grupa związków chemicznych, szeroko rozpowszechniona wśród roślin. Charakteryzują się bardzo dużymi zdolnościami przeciwutleniającymi. Aktualnie prowadzi się intensywne badania tej grupy pod kątem hamowania rozwoju nowotworów. Ponieważ trudno przechodzą z jelita do krwi, ich spożywanie zapobiega rozwojowi nowotworów jelita grubego czy odbytnicy [294, 295].

Do pokarmów roślinnych o najsilniejszym potencjale antynowotworowym zalicza się:

- ✓ warzywa nieskrobiowe: kapustne (kapusty głowiaste, brokuły, kalafior, brukselka, jarmuż) oraz czosnkowate (czosnek, cebula, por, szalotka, szczypior),
- ✓ owoce (borówka, żurawina, jeżyna, malina, poziomka),
- ✓ soję (surowe ziarna, sos sojowy, tofu, mleko sojowe),
- ✓ kurkumę [296].

Cytotoksyczność jest to jeden z podstawowych rodzajów mechanizmów działania chemioterapeutyków stosowanych w farmakoterapii. Do określenia aktywności cytotoksycznej leków przeciwnowotworowych w warunkach *in vitro* możemy zastosować liczne techniki pozwalające na pomiar zmian związanych z zaburzeniami procesów fizjologicznych komórek ludzkich (lub zwierzęcych) powodowanych przez badany związek. Analiza zmian aktywności procesów komórkowych jest wykonywana dla hodowli komórkowej poddanej działaniu badanej substancji, w odniesieniu do kontroli stanowiącej hodowlę bez leku, najczęściej przy użyciu technik kolorymetrycznych, fluorymetrycznych, bioluminescencyjnych lub izotopowych. Testy stosowane do oceny cytotoksyczności pozwalają na bezpośredni bądź pośredni pomiar różnych zmian, odzwierciedlających aktywność cytotoksyczną. Polegać mogą one m.in. na:

- ✓ pomiarze liczby żywych komórek (niekiedy w połączeniu z określeniem integralności błony komórkowej),
- ✓ oznaczeniu aktywności enzymatycznej związanej z metabolizmem komórki,
- ✓ określeniu zdolności do podziałów komórkowych (stopień proliferacji),
- ✓ określeniu całkowitej zawartości białka lub DNA w hodowli komórkowej [297-305].

Obecnie opracowanych i stosowanych jest wiele testów i rozwiązań technicznych. Jedną z popularnych analiz jest metoda kolorymetryczna, która określa proporcje proliferujących i martwych komórek w badaniach cytotoksyczności - test MTS. Oparty jest on na zdolności enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej do konwersji soli tetrazolowej do barwnego formazanu. Wykorzystaną, barwną solą jest żółty 3-(4,5-dimetylotioazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazol inaczej zwany solą błękitu tetrazolowego, który jest przekształcany przez żywe komórki w czerwono-purpurowy formazan. Ilość wytworzonego formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek, a zdolność do jego produkcji mają wyłącznie żywe komórki. Pozwala to na szybkie i dokładne określenie procentu żywych komórek oraz wpływu badanego czynnika na żywotność dowolnej linii komórkowej [306-310].

### III. Cele pracy

Poniżej przedstawione zostały cele badawcze niniejszej rozprawy doktorskiej:

1. Wykorzystanie technik chromatograficznych (TLC i HPLC) w celu porównania zawartości wybranych frakcji związków fenolowych w poszczególnych gatunkach tymianku, szalwii i pszczelnika,
2. Porównanie składu olejków eterycznych w wybranych gatunkach tymianku techniką GC-MS oraz porównanie efektywności dwóch zastosowanych technik wyodrębniania związków lotnych z materiału roślinnego dla trzech gatunków,
3. Chemometryczna optymalizacja warunków ekstrakcji związków nielotnych z tymianku,
4. Chemometryczne porównanie zawartości związków fenolowych dla sześciu wybranych gatunków tymianku,
5. Zastosowanie chromatograficznych „odcisków palca” (czyli tzw. fingerprintów) do identyfikacji badanych gatunków tymianku technikami TLC i HPLC,
6. Badanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych gatunków tymianku z zastosowaniem dwóch charakterystycznych odczynników DPPH oraz ABTS technikami:
  - ✓ spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR),
  - ✓ chromatografii cienkowarstwowej (TLC),
  - ✓ spektrofotometrii UV-Vis,
7. Analiza chemometryczna zdolności antyoksydacyjnych,
8. Badanie właściwości przeciwbakteryjnych dla poszczególnych gatunków tymianku,
9. Badanie właściwości przeciwnowotworowych dla poszczególnych gatunków tymianku,
10. Chemometryczna analiza oznaczonych właściwości biologicznych.

#### **IV. Część doświadczalna**

## 1. Aparatura i odczynniki

W czasie przygotowania materiału roślinnego oraz podczas wykonywania badań wykorzystano następujący sprzęt laboratoryjny: °C

- ✓ szkło laboratoryjne,
- ✓ aparat Derynga do destylacji z parą wodną (ChemLand, Stargard Szczeciński, Polska),
- ✓ szklane fiołki z kapslami z membranami teflonowo - silikonowymi (Thermo Scientific, Waltham, MA),
- ✓ elektryczny młynek MSM6260 400W firmy Bosch (Stuttgart, Niemcy),
- ✓ waga laboratoryjna WXD 200/2000 firmy RADWAG (Radom),
- ✓ płaszcz grzewczy z regulacją mocy SXXW - 98IB firmy ChemLand (Stargard Szczeciński),
- ✓ magnetyczne mieszadło z funkcją grzania RCT basie IKAMAG firmy IKA (Staufen, Niemcy),
- ✓ pHmetr Orion 4 - Star Plus (Nijkerk, Holandia),
- ✓ pipety automatyczne firmy Socorex od 10 do 1000 µl (Ecublens, Szwajcaria),
- ✓ rotacyjna wyparka próżniowa RV 10 digital VC firmy IKA (Staufen, Niemcy),
- ✓ zestaw do oczyszczania wody Elix Advantage 3 System firmy Millipore (Molsheim, Francja),
- ✓ automatyczny aplikator do TLC AS-30 firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy),
- ✓ komory chromatograficzne DS typu *sandwich* firmy Chromdes (Lublin),
- ✓ lampa UV firmy Camag (MuttENZ, Szwajcaria),
- ✓ chromatograf ciekłowy Varian 920-LC wyposażony w autosampler 900-LC, pompę gradientową, detektor fotodiodowy 330 DAD oraz fotodyspersyjny detektor laserowy (ELSD) Varian 385 LC (Santa Clara, Kalifornia, USA),
- ✓ kolumna chromatograficzna firmy Varian, typu Pursuit C<sub>18</sub> o wymiarach 250 mm x 4,6 mm; grubość ziarna 5 µm (Harbor City, Kalifornia, USA),
- ✓ filtry strzykawkowe Anotop firmy Merck (Darmstadt, Niemcy),
- ✓ chromatograf gazowy Trace 2000 (kolumna kapilarna RTX-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) sprzężony z detektorem mas MS Trace (Thermo Quest, Waltham, MA, USA), wyposażony w autosampler Combi PAL (CTC, Basel, Szwajcaria), który pracuje także w trybie *head space*, z oprogramowaniem X-Calibur i biblioteką widm masowych NIST (ang. *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, MD, USA),
- ✓ ciśnieniowy ekstraktor rozpuszczalnikowy ASE 200 firmy Dionex (Sunnyvale, Kalifornia, USA),
- ✓ densytometr skaningowy model CD 60 firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy),



- ✓ chromatograf cieczowy Gynkotek P 580A LPG wyposażony w autosampler Gynkotek Gina 50, pompę Gynkotek P 580A LPG oraz detektor fotodiodowy DAD UVD 340U (Germering, Niemcy),
- ✓ komora zanurzeniowa TLC Immersion Device (Camag, Muttentz, Szwajcaria),
- ✓ kamera cyfrowa Repostar (Camag, Muttentz, Szwajcaria),
- ✓ mieszadło magnetyczne silnikowe MS11 (WIGO, Pruszków),
- ✓ planimetr biegunowy (HAFF, Pfronten, Niemcy),
- ✓ cieplarka BINDER - seria BD (Tuttlingen, Niemcy),
- ✓ spektrofotometr UV-Vis model V-530 (Jasco, Tokio, Japonia),
- ✓ spektrometr Bruker EMX EPR (Bruker-Biospin, Rheinstetten, Niemiec),
- ✓ czytnik płytek wielodołkowych Synergy<sup>TM</sup>4 (Bio-Tek, USA),
- ✓ suszarka laboratoryjna model S-40 (Alpina, Polska).

W niniejszej pracy wykorzystano płytki chromatograficzne firmy Merck pokryte:

- ✓ żelem krzemionkowym 10 cm x 20 cm SiO<sub>2</sub> 60 F<sub>254</sub> (Nr. kat. 1.05729),
- ✓ mikrokrystaliczną celulozą 20 cm x 20 cm (Nr. kat. 1.05716).

Podczas przygotowywania i analizy próbek użyto następujących odczynników chemicznych o stopniu czystości cz.d.a., wyprodukowanych przez firmę POCH (Gliwice, Polska):

- ✓ aceton (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>),
- ✓ eter naftowy,
- ✓ metanol (CH<sub>3</sub>OH),
- ✓ eter dietylowy (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>),
- ✓ wodorowęglan sodu (5% NaHCO<sub>3</sub>),
- ✓ węglan sodu (5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>),
- ✓ kwas solny (18%, 36% HCl),
- ✓ bezwodny siarczan(VI) sodu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),
- ✓ octan etylu (CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>),
- ✓ 1-butanol (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH),
- ✓ borowodorek sodu (NaBH<sub>4</sub>),
- ✓ wodorotlenek baru (10% Ba(OH)<sub>2</sub>),
- ✓ kwas siarkowy(VI) (10%, 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),
- ✓ benzen (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>),
- ✓ etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH),
- ✓ kwas mrówkowy (HCOOH),
- ✓ toluen (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>),
- ✓ kwas octowy (CH<sub>3</sub>COOH),
- ✓ chlorek glinu (AlCl<sub>3</sub>),

- ✓ ksylen ( $C_8H_{10}$ ),
- ✓ dichlorometan ( $CH_2Cl_2$ ),
- ✓ heksan ( $C_6H_{14}$ ).

Do analiz używano wody redestylowanej otrzymanej w zestawie do oczyszczania wody Elix Advantage 3 System w laboratorium Uniwersytetu Śląskiego.

Jako substancje wzorcowe wykorzystano:

- ✓ kwas kawowy (ChromaDex, Santa Ana, CA, USA),
- ✓ kwas rozmarynowy (ChromaDex, Santa Ana, CA, USA),
- ✓ trolox (Acros Organics, Geel, Belgia),
- ✓ kwas galusowy (POCH, Gliwice, Polska),
- ✓ kwas askorbinowy (POCH, Gliwice, Polska).

W celu określenia właściwości przeciwutleniających jako źródło wolnych rodników wykorzystano następujące substancje:

- ✓ 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl, DPPH (Sigma - Aldrich, Poznań, Polska),
- ✓ 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian), ABTS (Sigma - Aldrich, Poznań, Polska).

W celu określenia właściwości przeciwbakteryjnych użyto kolonii bakteryjnej pobranej z kultury *Bacillus subtilis* (Gram-pozytywne, ATCC 6633). Substancją wykorzystaną do wizualizacji był bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy, MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Określenie właściwości przeciwnowotworowych wykonano na komórkach linii HCT116 (American Type Culture Collection, USA). Jako odczynnik do testu MTS wykorzystano CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solutions - MTS (Promega). Komórki hodowano jako hodowle jednowarstwowe w kolbach 75 cm<sup>3</sup> (Nunc) w zmodyfikowanym Dulbecco's podłożu Eagle's: pożywka F-12 (DMEM/F/12). Podłoże było z dodatkiem 12% inaktywowanej surowicy płodów wołowych (PAA) dla HCT116 oraz 15% surowicy płodów wołowych (Gibco) w przypadku linii NHDF oraz 100 µg/mL gentamycyny (Gibco).

## 2. Materiał roślinny

W pierwszej części badań jako materiał roślinny wykorzystano trzy rodzaje roślin należące do rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*): szalwia, tymianek oraz pszczelnik. Surowiec pochodził z Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (Polska). Materiał do badań stanowiło sześć gatunków i odmian roślin: *Salvia triloba*, *Salvia staminea*, dwie formy botaniczne pszczelnika mołdawskiego (*Dracocephalum moldavica*) o białych i niebieskich kwiatostanach, *Thymus serpyllum* oraz *Thymus vulgaris*. W tabeli 1 przedstawiono dokładny wykaz stosowanych do badań roślin. Surowiec roślinny został wysuszony w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 35-40°C przez 40 godzin. W kolejnym etapie suchy materiał roślinny został rozdrobniony, a następnie przechowywany w lodówce do momentu rozpoczęcia analizy.

Tab.1. Wykaz roślin wykorzystanych w pierwszym etapie badań.

Lp.	Rodzaj	Gatunek i odmiana	Rok zbioru
1	szalwia	<i>Salvia triloba</i>	2009
2	szalwia	<i>Salvia staminea</i>	2009
3	pszczelnik	<i>Dracocephalum moldavica</i> (gatunek z białym kwiatostanem)	2011
4	pszczelnik	<i>Dracocephalum moldavica</i> (gatunek z niebieskim kwiatostanem)	2011
5	tymianek	<i>Thymus serpyllum</i>	2011
6	tymianek	<i>Thymus vulgaris</i>	2011

W kolejnym etapie badań jako surowiec roślinny wykorzystano wybrane gatunki tymianku, które pochodziły z Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Marii Curie - Skłodowskiej (Lublin, Polska). Materiał roślinny został zebrany w lipcu 2012 roku. Gatunki tymianku, które zostały poddane badaniom przedstawia tabela 2. Surowiec roślinny został wysuszony w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 35-40°C przez 40 godzin.

Tab.2. Analizowane gatunki tymianku oraz miejsca ich hodowli w Ogrodzie Botanicznym.

Lp.	Nazwa gatunku	Miejsce hodowli w Ogrodzie Botanicznym
1	<i>T. vulgaris</i>	użytkowy
2	<i>T. serpyllum</i>	arboretum
3	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	alpinarium
4	<i>T. kosteleckyanus</i>	śródziemnomorski
5	<i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' ziele	systematyka
6	<i>T. marschallianus</i>	alpinarium
7	<i>T. degenii</i>	śródziemnomorski
8	<i>T. pseudolanuginosus</i>	arboretum
9	<i>T. pannonicus</i>	alpinarium
10	<i>T. austriacus</i>	arboretum
11	<i>T. praecox</i> 'pygmaeus'	alpinarium
12	<i>T. tiflisiensis</i>	użytkowy
13	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	użytkowy
14	<i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' korzeń	systematyka
15	<i>T. serpyllum</i> 'aureus'	arboretum
16	<i>T. serpyllum</i> 'albus'	użytkowy
17	<i>T. serpyllum</i>	systematyka
18	<i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i>	alpinarium

Suchy materiał roślinny przeznaczony do badań został rozdrobniony, a następnie przechowywany w lodówce do momentu rozpoczęcia analizy.

### **3. Metody ekstrakcji wykorzystane w badaniach**

#### **3.1. Związki lotne**

##### **3.1.1. Ekstrakcja w aparacie Derynga**

W kolbie okrągłodennej o pojemności 500 mL umieszczono 25 g wcześniej przygotowanego materiału roślinnego, a następnie dodano 300 mL wody destylowanej. Po dodaniu zarodników wrzenia, rozpoczęto proces destylacji z parą wodną w aparacie Derynga. Destylacja prowadzona była przez 3 godziny. Po zakończeniu destylacji zebrano destylat, którym był żółtobrunatny olejek eteryczny, do odpowiednio przygotowanych fiolek. W celu lepszego wydobywania olejku z materiału roślinnego, w trakcie analizy dodano 0,5 mL ksylenu (procedura opisana w Polskiej Farmakopei VI [311]). Całkowita objętość uzyskanego destylatu wynosiła około 0,70 mL. Tak uzyskany olejek eteryczny odwodniono dodając bezwodnego siarczanu(VI) sodu. Następnie przygotowano 1% metanolowy roztwór olejku i przeznaczono go do analizy. Ekstrakcji poddano trzy gatunki tymianku *Thymus vulgaris*, *Thymus pulegioides* oraz *Thymus kosteleckyanus*. Następnie odpowiednie porcje (1  $\mu$ L) tak przygotowanych roztworów przeznaczono do analizy techniką GC-MS.

##### **3.1.2. Analiza fazy nadpowierzchniowej**

Odpowiednio przygotowany materiał roślinny odważono w ilości 1,5 g każdego z badanych gatunków tymianku i umieszczono w fiolkach do analizy nadpowierzchniowej o objętości 10 mL. Tak otrzymane fiolki zamykano kapslami z membranami teflonowo - silikonowymi. Następnie przygotowana próbka była umieszczana w termostacie automatycznego dozownika (autosamplera) i wygrzewana w temperaturze 100°C przez 15 min. Próbkę fazy gazowej z nad powierzchni materiału roślinnego była dozowana przy użyciu dozownika automatycznego do chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas w objętości 500  $\mu$ L. Badaniom poddano wszystkie gatunki tymianku analizą fazy nadpowierzchniowej techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HS-GC-MS).

#### **3.2. Związki nietlotne**

##### **3.2.1. Wielostopniowa ekstrakcja związków fenolowych z materiału roślinnego**

Wielostopniowa ekstrakcja kwasów fenolowych oraz flawonoidów została przeprowadzona według procedury opisanej w literaturze [312-317]. Przygotowany susz przeznaczono do wyodrębniania kwasów fenolowych i flawonoidów wykorzystując w tym

celu ekstrakcję typu ciecz-ciało stałe w aparacie Soxhleta, a następnie ekstrakcję typu ciecz-ciecz.

Porcję 25 g wysuszonego i rozdrobnionego materiału roślinnego umieszczono w gilzie z bibuły filtracyjnej w aparacie Soxhleta i poddano 24-godzinnej maceracji, a następnie wyczerpującej ekstrakcji eterem naftowym (do momentu uzyskania bezbarwnego rozpuszczalnika w części ekstrakcyjnej aparatu Soxhleta). Wyciąg eterowy odrzucono, gdyż ekstrakcja ta miała na celu częściowe pozbycie się barwników oraz odłuszczenie materiału roślinnego. Po wysuszeniu gilzę z surowcem ponownie umieszczono w aparacie Soxhleta i przeprowadzono 24-godzinną macerację, a następnie wyczerpującą ekstrakcję metanolem. Otrzymany w ten sposób ekstrakt metanolowy odparowano do sucha w wyparce próżniowej w temperaturze nie przekraczającej 50°C. Suchą pozostałość wymywano czterema porcjami gorącej wody po 25 mL każda i pozostawiono w chłodnym miejscu na 24 godziny. Następnie ekstrakt wodny przesączono w celu oddzielenia go od wytrąconego osadu zawierającego balasty. Przesącz ekstrahowano siedmioma porcjami po 20 mL eteru dietylowego, aż do jego odbarwienia. W ten sposób otrzymano warstwę eterową, a pozostały ekstrakt wodny przeznaczono do dalszej ekstrakcji.

Warstwę eterową wytrząsano z ośmioma porcjami po 20 mL 5% wodnego roztworu wodorowęglanu sodu w celu przeprowadzenia kwasów fenolowych w sole rozpuszczalne w wodzie. Następnie warstwę eterową poddano ekstrakcji siedmioma porcjami po 20 mL 5% wodnego roztworu węglanu sodu, aż do zaniku jego zabarwienia.

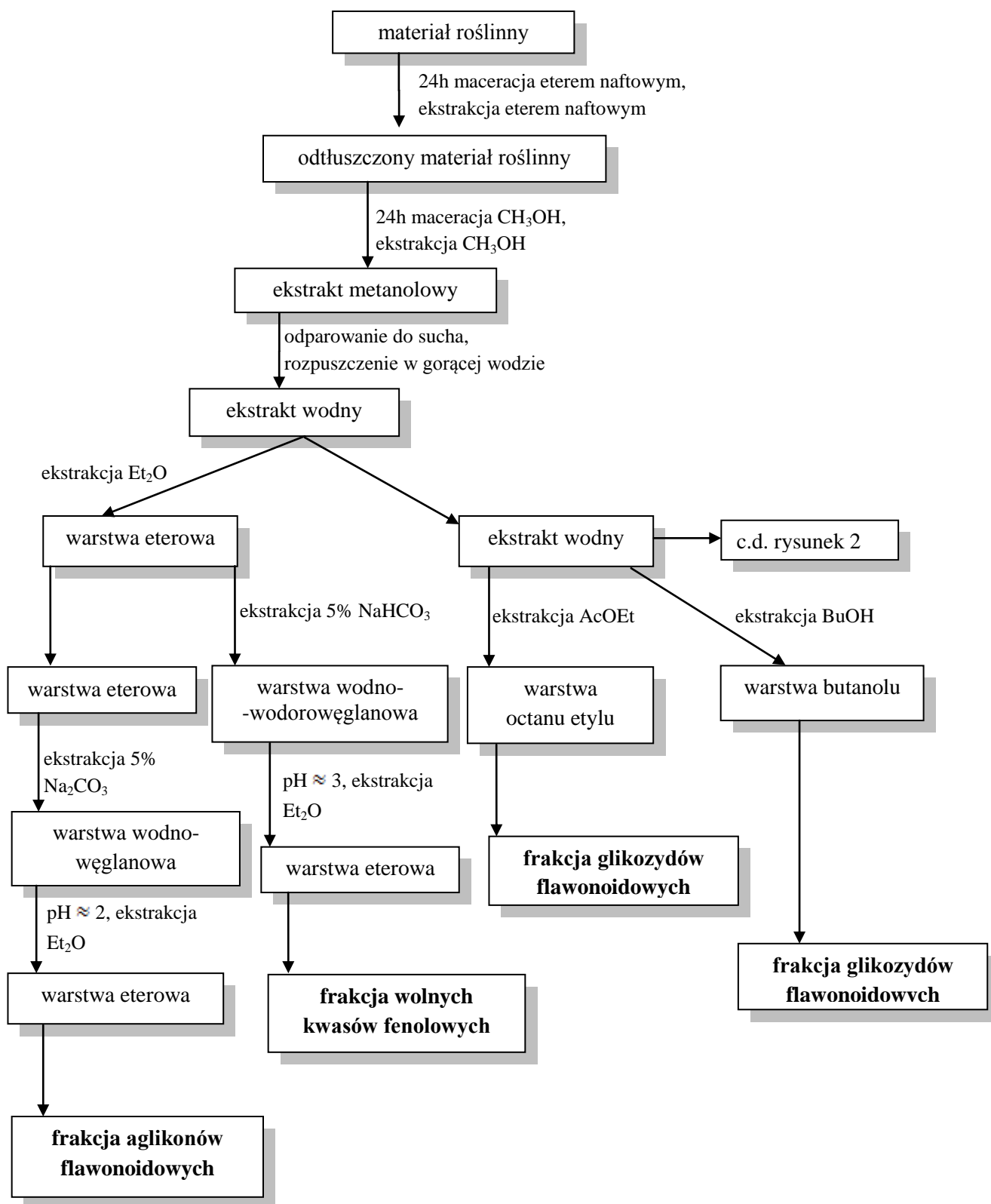
Pozostałą warstwę eterową odrzucono, a do warstwy wodno-węglanowej dodano 18% roztwór kwasu solnego do uzyskania  $\text{pH} \approx 2$ . Następnie roztwór ten ekstrahowano sześcioma porcjami po 20 mL eteru dietylowego, aż do jego odbarwienia. Frakcje eterowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu i przesączono. Eter odparowano w wyparce próżniowej, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 mL. Tak otrzymany roztwór przeznaczono do oznaczania zawartości aglikonów flawonoidowych.

Warstwę wodno-wodorowęglanową poddano działaniu 18% roztworu kwasu solnego, aż do uzyskania  $\text{pH} \approx 3$  w celu uwolnienia kwasów fenolowych. Następnie warstwę ekstrahowano sześcioma porcjami po 20 mL eteru dietylowego, aż do zaniku jego zabarwienia. Połączone wyciągi eterowe osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu i przesączono. Rozpuszczalnik odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną suchą pozostałość zawierającą wolne kwasy fenolowe rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 mL.

Pozostały po ekstrakcji eterem dietylowym ekstrakt wodny ekstrahowano dziewięcioma porcjami po 20 mL octanu etylu, zbierając za każdym razem warstwę

organiczną. Ekstrakcję prowadzono aż do odbarwienia octanu etylu. Następnie warstwę wodną odmywano ośmioma porcjami po 20 mL 1-butanolu, aż do zaniku jego zabarwienia. Otrzymane warstwy (octanową i butanolową) osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, przesączono i odparowano do sucha w wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolb miarowych o pojemności 10 mL. W ten sposób otrzymano dwie frakcje glikozydów flawonoidowych.

Pozostały po ekstrakcji octanem etylu i butanolem ekstrakt wodny podzielono na dwie równe części, które poddano hydrolizie. Procedurę przygotowania próbki przedstawiono na rysunku 1.

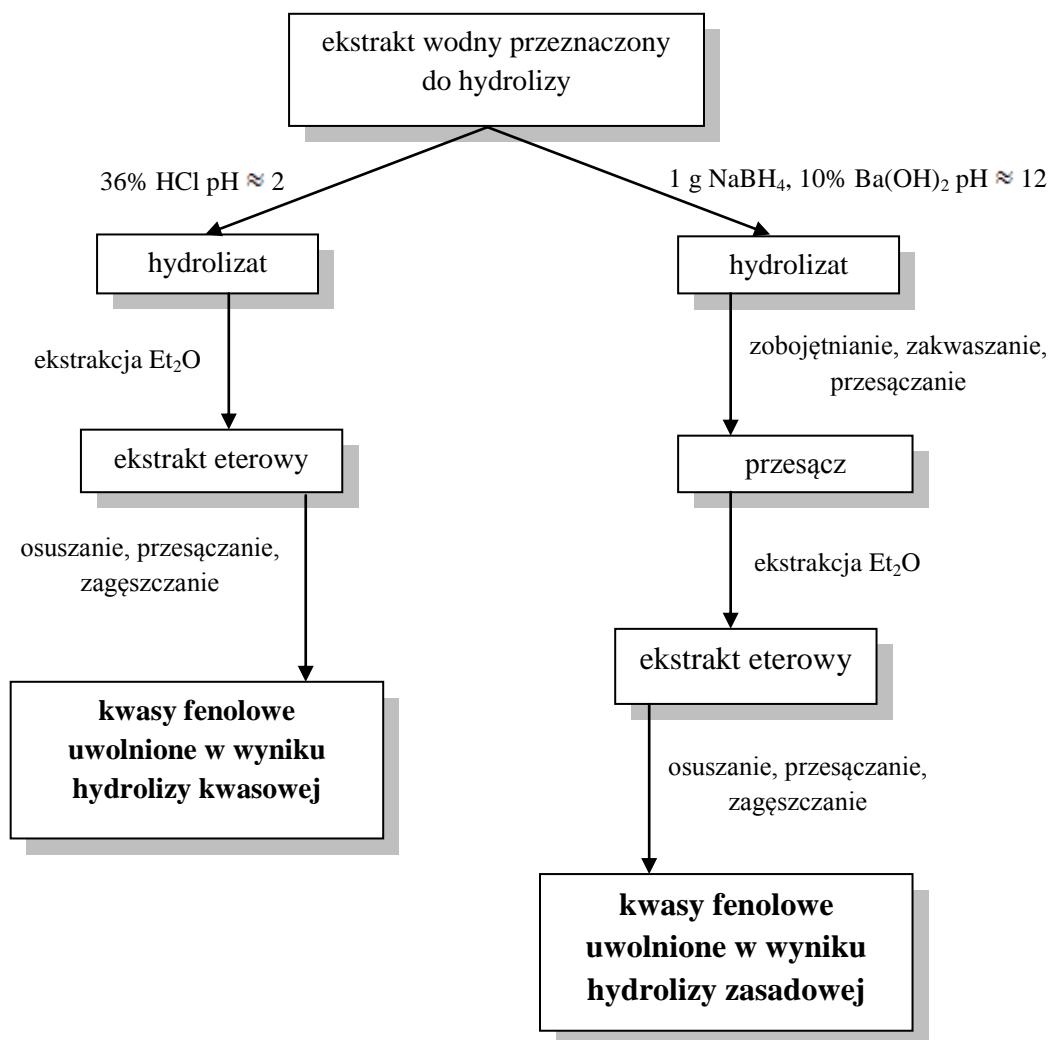


Rys.1. Schemat izolacji frakcji flawonoidowych oraz frakcji wolnych kwasów fenolowych.



Pierwszą część ekstraktu wodnego poddano hydrolizie zasadowej, by uwolnić kwasy fenolowe związane estrowo. Dodano 1 g borowodorku sodu w celu ochrony kwasów fenolowych przed utlenieniem. Następnie przy użyciu 10% wodnego roztworu wodorotlenku baru doprowadzono roztwór do pH  $\approx$  12. Całość utrzymywano we wrzeniu na łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę. Hydrolizat ostudzono, zobojętniono 10% roztworem kwasu siarkowego, a następnie zakwaszono stężonym kwasem siarkowym(VI) do pH  $\approx$  1,5. Wytrącony w ten sposób osad siarczanu(VI) baru odsączono, a uzyskany przesącz poddano ekstrakcji pięcioma porcjami po 20 mL eteru dietylowego, aż do zaniku jego zabarwienia. Otrzymane ekstrakty eterowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu i przesączono. Rozpuszczalnik oddestylowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 mL. Otrzymano w ten sposób frakcję kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej.

Do drugiej części ekstraktu wodnego dodano 36% kwasu solnego w celu zakwaszenia roztworu do pH  $\approx$  2. Następnie całość ogrzewano na łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę. Hydrolizat ostudzono, a następnie poddano ekstrakcji pięcioma porcjami po 20 mL eteru dietylowego, aż do jego odbarwienia. Warstwy eterowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu i przesączono. Rozpuszczalnik oddestylowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 mL. Otrzymano w ten sposób frakcje kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej. Procedurę przygotowania próbki przedstawiono na rysunku 2.



Rys.2. Schemat hydrolizy kwasowej i hydrolizy zasadowej kwasów fenolowych wybranych ekstraktów.

Tab.3. Opis sześciu otrzymanych frakcji wraz z ich akronimami.

<b>Frakcja</b>	<b>Akronim</b>	<b>Charakterystyka</b>
wolne kwasy fenolowe	WKF	wolna forma występująca w roślinach
związane kwasy fenolowe (1)	KKF	forma związana występująca w roślinach, uwolniona w wyniku hydrolizy kwasowej
związane kwasy fenolowe (2)	ZKF	forma związana występująca w roślinach, uwolniona w wyniku hydrolizy zasadowej
aglikony flawonoidowe	AF	wolna forma występująca w roślinach
glikozydy flawonoidowe (1)	GFO	mało polarne glikozydy flawonoidowe (uzyskane w wyniku ekstrakcji za pomocą octanu etylu)
glikozydy flawonoidowe (2)	GFB	polarne glikozydy flawonoidowe (uzyskane w wyniku ekstrakcji za pomocą n-butanolu)

W ten sposób uzyskano dwie frakcje glikozydów flawonoidowych, frakcję aglikonów flawonoidowych, frakcje wolnych kwasów fenolowych, jak również frakcję kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej i hydrolizy zasadowej. Otrzymane frakcje dla wszystkich sześciu gatunków należących do rodziny jasnotowatych poddano analizie techniką TLC oraz HPLC.

### **3.2.2. Chemometryczna optymalizacja warunków ekstrakcji**

W celu zoptymalizowania warunków przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej wykorzystano gatunek tymianku pospolitego (*Thymus vulgaris*) dostępny komercyjnie. Podczas analizy porównano dwie techniki ekstrakcyjne: ekstrakcję w aparacie Soxhleta oraz ekstrakcję ASE.

#### **Przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikowa (ASE)**

Wysuszony i rozdrobniony materiał roślinny odważono w ilości 8 g (dla każdego powtórzenia), a następnie przeniesiono do gilzy z bibuły. Całość poddano 24 godzinnej maceracji n-heksanem w aparacie Soxhleta. Następnie przeprowadzono wyczerpującą ekstrakcję (około 40 h) w celu odtłuszczenia surowca i pozbycia się części chlorofilu. Po tym czasie materiał roślinny wysuszono, odważono w ilości 0,5 g, a następnie przeniesiono do odpowiednio przygotowanych celek z metalu nierdzewnego. Temperatura oraz stężenie rozpuszczalnika zastosowane podczas analizy zostały odpowiednio wybrane podczas planowania eksperymentu za pomocą metody odpowiedzi powierzchni (RSM) używając centralnego planu kompozycyjny (CCD). Kompletny centralny plan kompozycyjny składał się z 13 eksperymentów zawierających 5 powtórzeń centralnego punktu (55% roztwór metanolu oraz temperatura 105°C). Odpowiednie kombinacje

stężenia metanolu oraz temperatury przedstawiono w tabeli 4. Przeprowadzona analiza ASE była prowadzona w warunkach przedstawionych w tabeli 5.

Tab.4. Kombinacje stężenia metanolu i temperatury dla odpowiednich eksperymentów.

<b>Eksperyment</b>	<b>Metanol [%]</b>	<b>Temperatura [°C]</b>
1	35	80
2	55	105
3	75	80
4	55	105
5	35	130
6	55	105
7	75	130
8	55	140
9	55	105
10	27	105
11	55	70
12	55	105
13	83	105

Tab.5. Warunki analizy dla przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej.

<b>Gaz</b>	<b>azot</b>
Płukanie	3-krotne
Ciśnienie	100 atm
Czas ogrzewania	5 min
Czas statyczny	5 min
Ilość cykli	5
Ilość powtórzeń	3

W kolejnym etapie badań, dla każdego eksperymentu celki przemyto świeżą porcją rozpuszczalnika i przedmuchano strumieniem gazu (90 s). W wyniku przeprowadzonej analizy otrzymano ekstrakty o objętości 37 mL, które przechowywano w ciemnym szkle w lodówce, aż do czasu przeprowadzenia analizy chromatograficznej. Dla każdego eksperymentu zostały wykonane dwa powtórzenia z wyjątkiem tych, gdzie warunkami analizy był 55% roztwór metanolu oraz temperatura 105°C. Łącznie otrzymano 21 ekstraktów.

### Ekstrakcja w aparacie Soxhleta

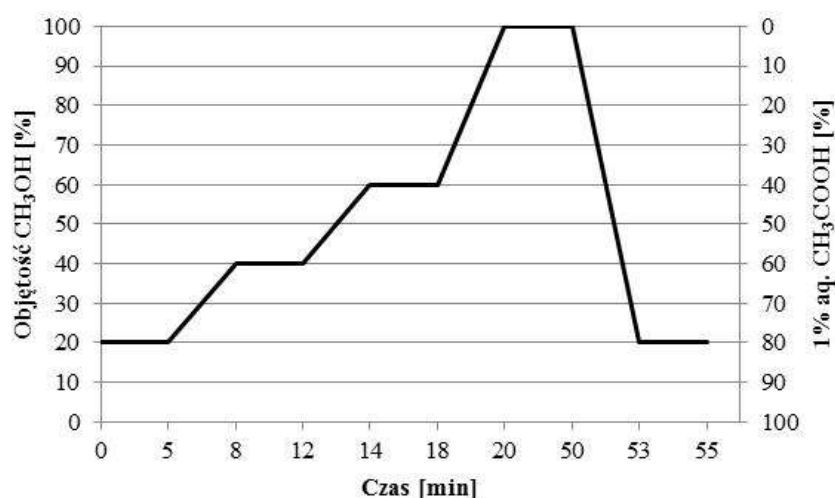
Wysuszony i zmielony materiał roślinny odważono w ilości 5 g (dla każdego powtórzenia), a następnie przeniesiono do gilzy z bibuły. Całość przeniesiono do aparatu Soxhleta i poddano 24 godzinnej maceracji n-heksanem. Następnie w celu pozbycia się części chlorofilu oraz odtłuszczenia materiału roślinnego przeprowadzono wyczerpującą ekstrakcję (około 35 h). Po tym czasie materiał roślinny wysuszono i ponownie przeniesiono do gilzy z bibuły. Całość poddano 24 godzinnej maceracji czystym metanolem, a następnie przeprowadzono wyczerpującą ekstrakcję (około 35 h). Uzyskane ekstrakty przeniesiono do pojemników z ciemnego szkła i przechowywano w lodówce do czasu przeprowadzenia dalszej analizy chromatograficznej. Ekstrakcję powtórzono trzykrotnie.

### Analiza techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Analizę przeprowadzono techniką TLC stosując komory chromatograficzne poziome typu „sandwich”. W celu rozdzielenia związków wykorzystano szklane płytki chromatograficzne pokryte żelalem krzemionkowym Si 60 F<sub>254</sub> (10 cm x 20 cm). Przed rozpoczęciem analizy płytki chromatograficzne aktywowano w temperaturze 110°C przez 15 minut. Uzyskane ekstrakty nanoszono na płytki punktowo szklanymi kapilarami w objętości 10 µL. Chromatogramy każdorazowo rozwijano w poziomych komorach, które uprzednio wysycano przez 15 minut porcjami fazy ruchomej. Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę octanu etylu, kwasu mrówkowego, kwasu octowego i wody w stosunku objętościowym 100:11:11:13 (modyfikacja fazy ruchomej opisanej w literaturze [318]). Chromatogramy rozwijano na wysokość 15 cm, a następnie suszono w standardowych warunkach przez 2 godziny. Po wysuszeniu płytki wywoływano przy użyciu substancji wywołującej, którą był 10% metanolowy roztwór kwasu siarkowego(VI), a następnie wygrzewano je w temperaturze 110°C przez 20 minut. Tak uzyskane chromatogramy zdensytometrowano w trybie fluorescencji stosując densytometr skaningowy Desaga model CD 60 z oprogramowaniem ProQuant. Każda z badanych próbek była densytometrowana w zakresie od 320 do 700 nm co 10 nm. Każdy ekstrakt uzyskany z ekstrakcji ASE lub z ekstrakcji w aparacie Soxhleta został poddany dwukrotnej analizie. Całkowita suma obrazów TLC (densytogramy uzyskane w warunkach opisanych wyżej) uzyskana dla optymalizacji eksperymentu to 42 dla ekstrakcji ASE, natomiast dla ekstrakcji w aparacie Soxhleta - 6. W takich samych warunkach jak badane próbki, otrzymane densytogramy płytek stanowiły tło, które jest niezbędne w dalszych badaniach. Otrzymane w ten sposób wyniki poddano analizie statystycznej w celu znalezienia optymalnych warunków ekstrakcji.

### Analiza techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Analizę techniką HPLC przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego Gyncotek P 580A LPG wyposażonego w automatyczny dozownik, pompę oraz detektor fotodiodowy. Wykorzystano kolumnę chromatograficzną firmy Varian, typu Pursuit C<sub>18</sub> o wymiarach 250 mm x 4,6 mm; grubość ziarna 5 µm. Dozowane objętości substancji wzorcowych kwasu rozmarynowego oraz kwasu kawowego wynosiły 10 µL. W celu zbadania zmian ilościowych kwasu rozmarynowego i kwasu kawowego przeprowadzono ekstrakcje ASE wcześniej odtłuszczonego i wysuszonego materiału roślinnego w odpowiednich temperaturach: 130°C, 140°C, 150°C, 175°C oraz 200°C. Przed wprowadzeniem ekstraktu do chromatografu, został on przesączony przy użyciu filtra strzykawkowego (0,02 µm). Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę metanolu oraz wody z dodatkiem 1% lodowatego kwasu octowego (v/v). Analizę przeprowadzono przy gradiencie rozpuszczalnikowym (rys.3.).



Rys.3. Profil gradientu zastosowany w analizie chromatograficznej.

Szybkość przepływu fazy ruchomej była stała i wynosiła 0,5 mL/min, a całkowity czas analizy wynosił 55 minut. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali  $\lambda = 250$  nm. Uzyskane wyniki przeanalizowano pod kątem zmiany zawartości kwasu kawowego i rozmarynowego w zależności od zastosowanej temperatury.

Optymalne warunki dla ekstrakcji ASE wyznaczono za pomocą metody RSM [319]. Plan CCD został wykorzystany w celu zbadania wpływu stężenia metanolu i temperatury ekstrakcji na całkowitą zawartość związków fenolowych w ekstraktach. Plan eksperymentu jest zazwyczaj stosowany do zdefiniowania powierzchni odpowiedzi drugiego rzędu. Model drugiego rzędu dla zakodowanych zmiennych można wyrazić następującym równaniem:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \varepsilon, \quad (1)$$

gdzie:  $\beta_0$  - wyraz wolny równania opisującego model drugiego rzędu,

$\beta_1, \beta_2$  - współczynniki regresji liniowej,

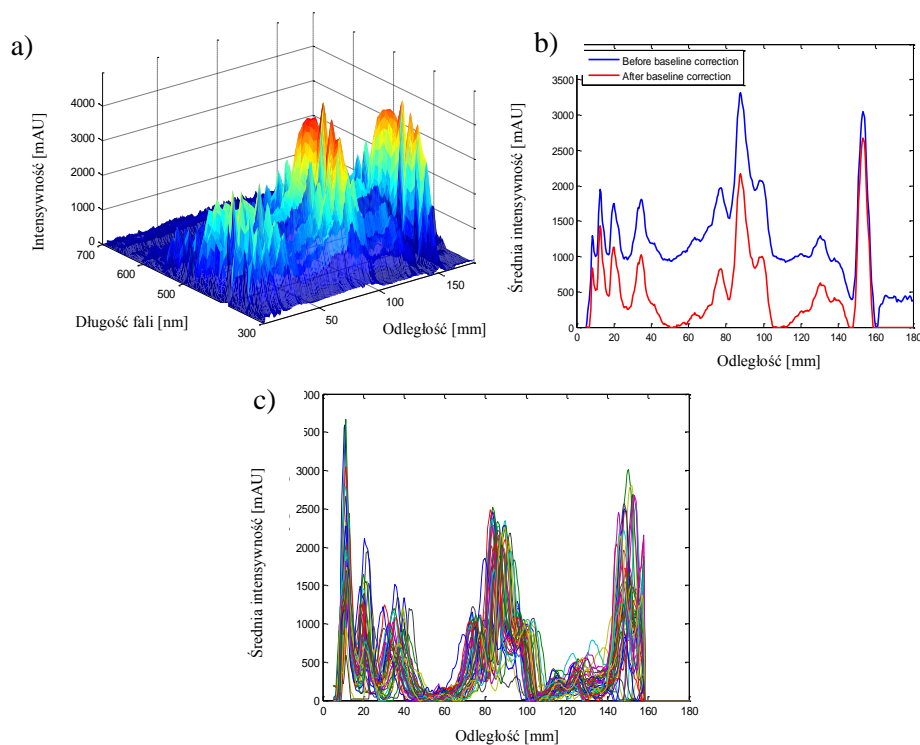
$\beta_{11}, \beta_{22}$  - kwadrat współczynników liniowych,

$\beta_{12}$  - interakcja współczynników  $x_1$  (stężenie metanolu) i  $x_2$  (temperatura ekstrakcji),

$\varepsilon$  - określenie błędu.

Zmienną odpowiedzi  $y$  reprezentuje średnie pole powierzchni pod densytogramami. Oszacowanie współczynników regresji w równaniu 1 zostało wykonane za pomocą wielorakiej regresji liniowej. Jest to możliwe, ponieważ model jest liniowy względem parametrów  $\beta$ , bez względu na kształt powierzchni jaki jest opisany. W celu sprawdzenia istotności współczynników regresji wykorzystano analizę wariancji (ANOVA) III-go typu dla sumy kwadratów. Model adekwatności został sprawdzony za pomocą analizy reszt, błędu dopasowania, współczynnika determinacji oraz jego wartości dopasowania  $R^2$  i  $R^2_{\text{det.}}$ . Założony poziom istotności wynosił 0,05 (wartość  $p < 0,05$ ).

Jak wspomniano wcześniej, pojedynczy obraz TLC (długość fali x odległość) został zarejestrowany dla każdej próbki otrzymanej z ekstrakcji w aparacie Soxhleta oraz otrzymanej z ekstrakcji ASE, ponieważ różna zawartość związków fenolowych została zabsorbowana przy różnej długości fali. Zazwyczaj sygnały instrumentalne wymagają wstępnego przygotowania przed dalszą analizą. Procedura wstępnego przygotowania obejmuje zwiększenie stosunku sygnału do szumu, eliminację linii podstawowej i nakładanie odpowiadających sobie pików. Tło zostało wyeliminowane poprzez odjęcie tła płytki (które zostało przeskanowane przy tym samym zakresie długości fali) od rozwiniętej płytki z ekstraktami. Przykład obrazu płytki po eliminacji tła przedstawia rysunek 4a.



Rys.4. Wstępne przygotowanie obrazów TLC: a) spektrochromatogram cienkowarstwowy dla danego ekstraktu ASE, b) densytogramy otrzymane poprzez uśrednienie intensywności dla długości fali w zakresie 320 - 520 nm dla obrazu TLC w a), c) uśrednione densytogramy ekstraktów ASE.

Średni densytogram został uzyskany dla każdej próbki poprzez uśrednienie sygnału intensywności w każdym punkcie pomiarowym wzdłuż długości fali w zakresie od 320 do 520 nm. Densytogramy, które zostały otrzymane przy najwyższych wartościach długości fali nie były brane pod uwagę, ze względu na zarejestrowaną małą wartość sygnału intensywności. Różnorodne podejścia estymujące kształt linii były użyte przy założeniu, że poziom szumu jest akceptowalnie niski, a linia podstawowa jest gładka, ale nieliniowa na przestrzeni wszystkich sygnałów.

W celu eliminacji linii podstawowej dla uśrednionych densytogramów wykorzystano metodę asymetrycznych najmniejszych kwadratów z funkcją kary (PALS) [320]. Wśród wielu różnych metod PALS jest preferowaną metodą ze względu na swoją prostotę i dobrą wydajność. Metoda PALS polega na modelowaniu linii podstawowej za pomocą podejścia iteracyjnego, które minimalizuje tzw. funkcję kosztów, opisującą dopasowanie aproksymowanej linii podstawowej do kształtu linii podstawowej sygnałów. Podczas tej procedury punkty zakładanej linii podstawowej, znajdujące się powyżej linii podstawowej sygnału, otrzymują mniejsze wagi niż te, które są zbliżone do wartości oryginalnej linii



podstawowej. Funkcja opisująca kształt aproksymowanej linii podstawowej ma następującą postać:

$$Q = \sum_i w_i (s_i - b_i)^2 + \lambda (\Delta^d b_i)^2, \quad (2)$$

gdzie:  $s_i$  - i-ty punkt sygnału,

$b_i$  - i-ty punkt przybliżonej linii podstawowej,

$\lambda$  - parametr kary,

$\Delta^d$  - różnice wynikające z zastosowania odpowiedniej pochodnej.

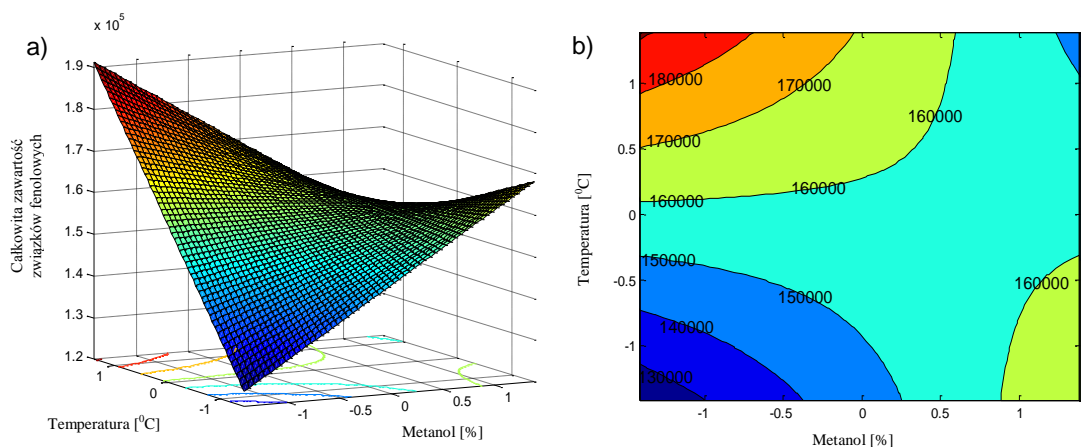
W większości ustawień, wybór  $d = 1$  lub  $2$  prowadzi do dobrego przybliżenia linii podstawowej. Parametr kary kontroluje stopień gładkości aproksymowanej linii podstawowej.

Średni densytogram, który został uzyskany z obrazu TLC (rys.4a.), przedstawia rys.4b. przed (niebieska linia) i po (czerwona linia) korekcji linii podstawowej. Wszystkie średnie densytogramy ekstraktów uzyskanych z ekstrakcji ASE po wstępnym przygotowaniu zostały przedstawione na rysunku 4c. Wstępne przygotowanie średnich densytogramów pozwala oszacować powierzchnie pod każdym z nich, co prowadzi do określenia całkowitej zawartości związków fenolowych ekstraktów, które zostały uzyskane przy użyciu ekstrakcji ASE lub ekstrakcji przy użyciu aparatu Soxhleta.

Dopasowanie pików jest możliwe wtedy, gdy stosunek sygnału do szumu dla pojedynczego średniego densytogramu jest prawidłowy. Przesunięcie pików może być spowodowane brakiem możliwości odtworzenia identycznych warunków eksperymentu. W wyniku tych przesunięć dodatkowa zmienność jest wprowadzona do danych eksperymentalnych, jednak nie posiada ona zawartości informacyjnej. Przesunięcia takie możemy zaobserwować dla poszczególnych próbek, dlatego też należy je usunąć. W tym celu wykorzystywane są techniki wstępnego przygotowania danych. W większości metod pozycje pików w sygnale są korygowane w odniesieniu do wybranego sygnału reprezentatywnego, który nazywany jest targetem. Ponieważ położenie przesuniętych pików jest z góry nieznane, metody te bazują na kształcie pików przyporządkowując je odpowiednio do siebie.

W celu usunięcia przesunięć pomiędzy pikami stosuje się głównie technikę zoptymalizowanego nakładania sygnałów, która maksymalizuje wzajemną korelację sygnałów (COW) [321]. W metodzie COW mamy funkcje pozwalające na dopasowanie sygnałów poprzez kompresję i rozciąganie fragmentów sygnału. W czasie tej procedury sygnał docelowy i sygnał, który jest dopasowany są podzielone na kilka sekcji, które

zawierają taką samą ilość punktów pomiarowych. Jest to kontrolowane za pomocą tak zwanego parametru elastyczności,  $t$ . Kiedy  $t=1$ , rozważane są trzy możliwe położenia sekcji końcowej, a więc dozwolone są trzy długości sekcji: o jeden punkt krótszy, bez zmian długości oraz z dłuższym o jeden punkt w odniesieniu do sekcji początkowej. Następnie wszystkie możliwe sekcje są interpolowane liniowo i porównywane z ich odpowiednikami, które zostały znalezione w sygnale docelowym, a ich stopień dopasowania jest oceniany za pomocą współczynnika dopasowania. Metoda COW polega na znalezieniu optymalnego położenia punktów pomiarowych tak, że po nałożeniu sygnału w poszczególnych sekcjach współczynnik korelacji jest maksymalny. Gdy liczba sekcji i parametr  $t$  są odpowiednio zoptymalizowane, przesunięcia pików mogą być skorygowane.



Rys.5. Centralny plan kompozycyjny a) płaszczyzna odpowiedzi oraz b) wykres konturowy przedstawiający wpływ stężenia metanolu i temperatury na całkowitą zawartość związków fenolowych.

Aby otrzymać największe stężenie związków fenolowych podczas prowadzenia ekstrakcji ASE został wykorzystany plan CCD z odpowiednimi kombinacjami warunków prowadzenia ekstrakcji - stężenie metanolu oraz temperatura (tab.4.). Wykres płaszczyzny odpowiedzi oraz wykres konturowy zostały przedstawione na rysunku 5. Wyniki dla ANOVA (analiza III-go typu dla sumy kwadratów) przedstawiono w tabeli 6.

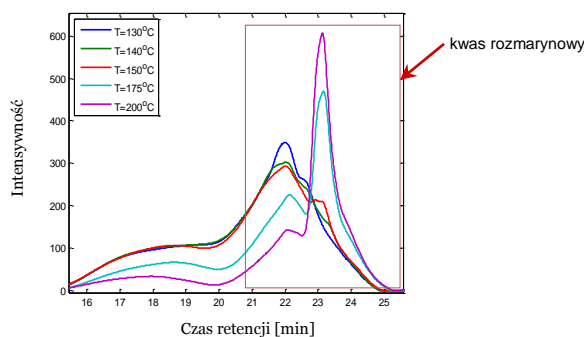
Tab.6. Wyniki dla ANOVA (analiza III-go typu dla sumy kwadratów).

Źródło wariancji	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średnia kwadratów	Wartość F	Wartość P
Model	$1,05 \times 10^{12}$	2	$5,24 \times 10^{11}$	1098,5	<0,0001
x <sub>1</sub> (metanol)	$1,80 \times 10^8$	1	$1,80 \times 10^8$	0,383	0,540
x <sub>2</sub> (temperatura)	$2,22 \times 10^9$	1	$2,22 \times 10^9$	4,709	0,037
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	$6,59 \times 10^8$	1	$6,59 \times 10^8$	1,397	0,245
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	$2,94 \times 10^8$	1	$2,94 \times 10^8$	0,623	0,435
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	$2,03 \times 10^9$	1	$2,03 \times 10^9$	4,303	0,045
Reszty	$1,86 \times 10^{10}$	39	$4,77 \times 10^8$		

Na podstawie wartości P, przedstawionych w tab.3, można wyciągnąć wniosek, że współczynniki regresji związane z działaniem temperatury (x<sub>2</sub>) oraz wpływem temperatury metanolu na stężenie związków fenolowych (x<sub>1</sub>x<sub>2</sub>) są statystycznie istotne (wartość P < 0,05). W związku z tym, model interakcji opisany jest za pomocą równania 3:

$$y = 1,58 \cdot 10^5 + 0,08 \cdot 10^5 x_2 - 0,11 \cdot 10^5 x_1 x_2 + \varepsilon \quad (3)$$

Zostało ono uznane za odpowiednie do przewidywania całkowitej zawartości związków fenolowych ekstraktów gatunku tymianku pospolitego z prawdopodobieństwem 99,9999. Oszacowany błąd dopasowania był mało istotny (wartość p > 0,05) i R<sup>2</sup> oraz R<sup>2</sup><sub>det.</sub> wynosiły odpowiednio 0,9826 oraz 0,9817. Kształt płaszczyzny odpowiedzi wskazuje, że optymalna temperatura dla uzyskanych ekstraktów tymianku, które są bogate w związki fenolowe ma najwyższą wartość jaka była rozważana w eksperymencie, czyli 140°C, a stężenie metanolu było 27%. Wyższa temperatura zwiększa rozpuszczalność związków fenolowych (zwiększa wydajność reakcji), ale w połączeniu z dużym ciśnieniem ekstrakcji ASE degradacja termiczna związków jest ograniczona. W tym celu zbadano, czy ma miejsce termiczny rozkład wybranych związków, takich jak kwas rozmarynowy. W związku z tym zawartość kwasu rozmarynowego zbadano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej dla ekstraktów uzyskanych przy pomocy ekstrakcji ASE w temperaturach: 130, 140, 150, 175 i 200°C i w optymalnym stężeniu metanolu 27%. Otrzymane chromatogramy przedstawiono na rysunku 6. Wraz ze wzrostem temperatury powyżej 130°C zaobserwowano spadek zawartości kwasu rozmarynowego, natomiast stwierdzono pojawienie się kwasu kawowego, który jest jednym z produktów rozkładu kwasu rozmarynowego. Można zatem zaobserwować rozkład termiczny. Ponieważ stwierdzono degradację termiczną kwasu rozmarynowego powyżej 140°C, jako końcową optymalną temperaturę wybrano 130°C. Spowodowało to nieznaczne zmniejszenie całkowitej zawartości związków fenolowych, które oszacowano poprzez pole powierzchni pod średnimi densytogramami.



Rys.6. Chromatogramy uzyskane techniką HPLC dla ekstraktów otrzymanych metodą ASE w określonych warunkach: metanol : woda, 27:73 (v/v) i w różnych temperaturach.

Końcowe, optymalne warunki uzyskane na podstawie centralnego planu kompozycyjnego dla ekstraktów gatunku tymianku pospolitego dla ekstrakcji ASE to temperatura 130°C oraz rozpuszczalnik metanol : woda, 27:73 (v/v). Walidacja modelu wykazała błąd względny 5%, który jest akceptowalny dla tego typu analizy. Całkowita zawartość związków fenolowych w ekstraktach uzyskanych za pomocą ekstrakcji ASE jest znacznie wyższa (blisko trzykrotnie) niż całkowita zawartość związków fenolowych dla ekstraktów uzyskanych za pomocą aparatu Soxhleta. Dlatego ekstrakcja ASE została zastosowana do dalszych badań poszczególnych gatunków tymianku w celu porównania zawartości związków fenolowych.

#### 4. Porównanie chromatograficznych fingerprintów dla roślin z rodziny jasnotowatych: szalwii, tymianku oraz pszczelnika

W wyniku przeprowadzenia wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych dla trzech rodzajów roślin: szalwii, tymianku i pszczelnika otrzymano sześć frakcji dla każdego z gatunków i odmian. Uzyskane frakcje to: octanowe glikozydy flawonoidowe, butanolowe glikozydy flawonoidowe, aglikony flawonoidowe, wolne kwasy fenolowe oraz kwasy fenolowe uwolnione w wyniku hydrolizy kwasowej i zasadowej.

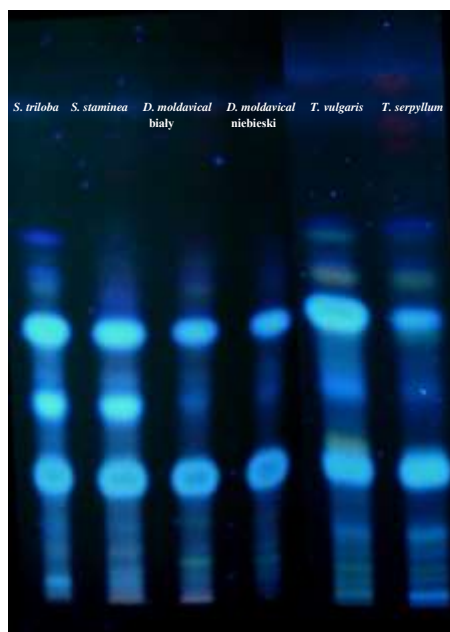
##### 4.1. Chromatografia cienkwarstwowa

Do analizy użyto płytek szklanych pokrytych żelem krzemionkowym Si 60 F<sub>254</sub> (10 cm x 20 cm), które uprzednio aktywowano w temperaturze 110°C przez 15 minut. Próbkę o objętości 10 µL nanoszono przy pomocy automatycznego aplikatora pasmami o długości 1 cm. Każdorazowo ekstrakty rozwijano w poziomych komorach typu sandwich, które uprzednio wysycano przez 15 minut porcjami fazy ruchomej. Próbkę rozwijano na wysokość 15 cm, po czym suszono je przez 3 godziny w standardowych warunkach. Po wysuszeniu chromatogramy fotografowano pod lampą UV przy dwóch długościach fali  $\lambda = 254 \text{ nm}$  i  $\lambda = 366 \text{ nm}$ . Następnie chromatogramy wywołało 1% metanolem roztworem chlorku glinu i ponownie fotografowano przy dwóch długościach fali.

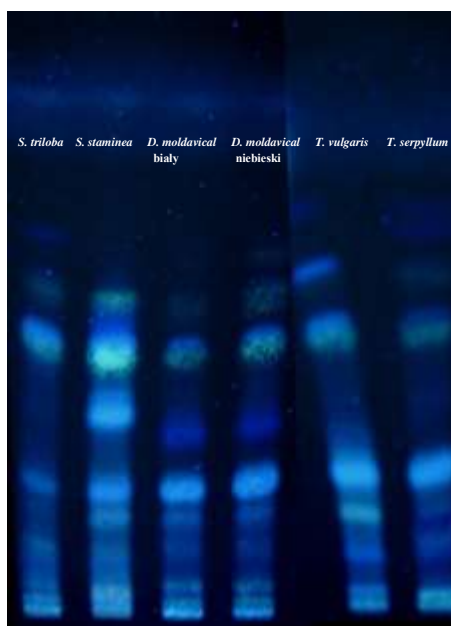
Tab.7. Układy chromatograficzne zastosowane do analizy frakcji związków fenolowych techniką chromatografii cienkwarstwowej.

Frakcje	Faza stacjonarna	Faza ruchoma
wolne kwasy fenolowe (WKF)	SiO <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> + AcOEt + HCOOH 6 : 3 : 1 (v/v) [322]
kwasy fenolowe uwolnione w wyniku hydrolizy zasadowej (ZKF)		
kwasy fenolowe uwolnione w wyniku hydrolizy kwasowej (KKF)		
aglikony flawonoidowe (AF)		C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> + AcOEt + HCOOH 12 : 6 : 1 (v/v) [323]
glikozydy flawonoidowe (GFO i GFB)		AcOEt + H <sub>2</sub> O + HCOOH + CH <sub>3</sub> COOH 100 : 26 : 11 : 11 (v/v)[324]

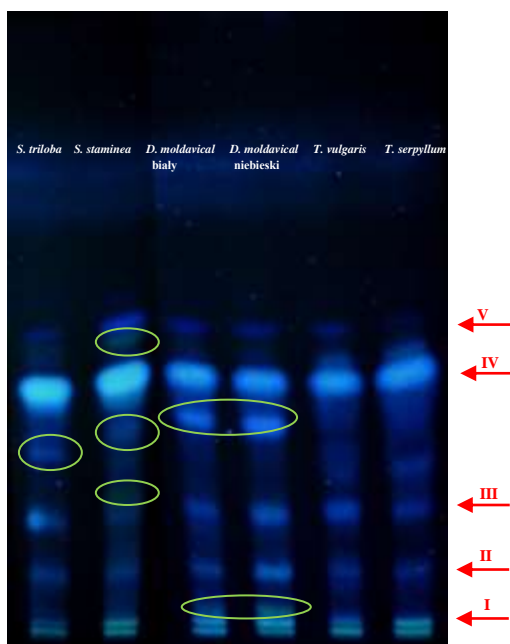
W wyniku przeprowadzonej analizy otrzymano fingerprinty dla poszczególnych gatunków i odmian, które przedstawiono na rysunkach poniżej (rys.7-11.). Analizując wszystkie uzyskane chromatogramy zauważono, że rejestracja przy długości fali  $\lambda = 366$  nm pozwala zaobserwować większą liczbę pasm w porównaniu z chromatogramami zarejestrowanymi przy długości fali  $\lambda = 254$  nm. W związku z tym, w przedstawionym poniżej omówieniu wyników skupiono się tylko na chromatogramach uzyskanych przy długości fali  $\lambda = 366$  nm. W końcowym etapie porównano otrzymane fingerprinty dla poszczególnych gatunków i odmian. W omówieniu poniżej skupiono się na trzech najbardziej interesujących frakcjach.



Rys.7. Chromatogramy ekstraktów frakcji wolnych kwasów fenolowych uzyskanych w wyniku wielostopniowej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowsarstwowej dla sześciu przebadanych gatunków. Rejestracja przy długości fali  $\lambda = 366$  nm.



Rys.8. Chromatogramy ekstraktów frakcji kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej uzyskanych w wyniku wielostopniowej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowsarstwowej dla sześciu przebadanych gatunków. Rejestracja przy długości fali  $\lambda = 366$  nm.

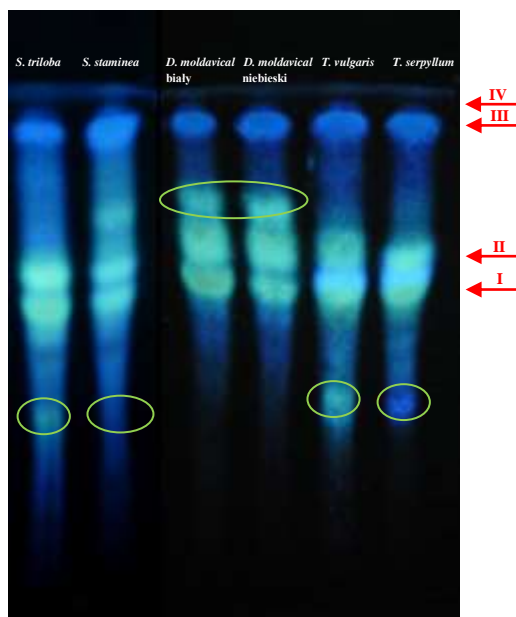


Rys.9. Chromatogramy ekstraktów frakcji kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej uzyskanych w wyniku wielostopniowej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowarstwowej dla sześciu przebadanych gatunków. Rejestracja przy długości fali  $\lambda = 366$  nm.

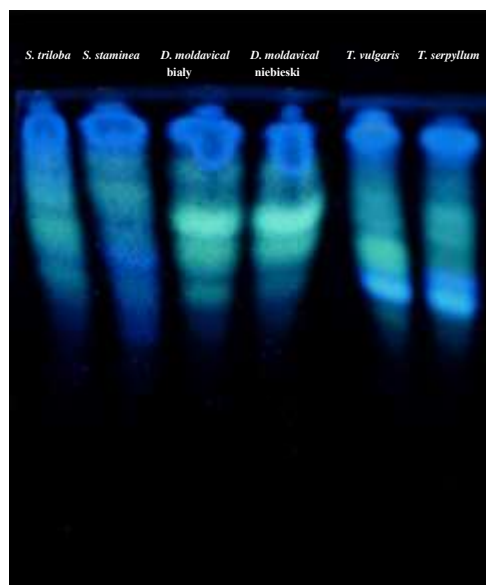


Rys.10. Chromatogramy ekstraktów frakcji aglikonów flawonoidowych uzyskanych w wyniku wielostopniowej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowarstwowej dla sześciu przebadanych gatunków. Rejestracja przy długości fali  $\lambda = 366$  nm.





Rys.11. Chromatogramy ekstraktów butanowych frakcji glikozydów flawonoidowych uzyskanych w wyniku wielostopniowej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowarstwowej dla sześciu przebadanych gatunków. Rejestracja przy długości fali  $\lambda = 366$  nm.



Rys.12. Chromatogramy ekstraktów octanowych frakcji glikozydów flawonoidowych uzyskanych w wyniku wielostopniowej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowarstwowej dla sześciu przebadanych gatunków. Rejestracja przy długości fali  $\lambda = 366$  nm.

Frakcja aglikonów flawonoidowych (AF) okazała się najważniejszą spośród sześciu uzyskanych frakcji, ponieważ w najlepszy sposób różnicuje wszystkie sześć badanych gatunków i odmian (rys.10.). Dzieje się tak, ponieważ oprócz jednego wspólnego pasma dla poszczególnych próbek, pozostałe są charakterystyczne wyłącznie dla każdej z nich. Dlatego frakcję AF możemy uznać za chromatograficzny marker. Pozostałe pięć frakcji (wolne kwasy fenolowe - WKF, kwasy fenolowe uwolnione w wyniku hydrolizy kwasowej - KKF, kwasy fenolowe uwolnione w wyniku hydrolizy zasadowej - ZKF, octanowa frakcja glikozydów flawonoidowych - GFO oraz butanolowa frakcja glikozydów flawonoidowych - GFB) ze względu na zawartość wyizolowanych związków fenolowych, nie są tak selektywne jak frakcja AF. Chromatogramy związków fenolowych uzyskane dla frakcji GFB oraz ZKF mogą również zostać wykorzystane w celu porównania między sobą badanych gatunków i odmian, ponieważ dobrze je różnicują, jednak ich zróżnicowanie jest mniejsze niż w przypadku frakcji AF.

Kolejną omawianą frakcją jest frakcja ZKF (rys.9.), dla której możemy zaobserwować pięć wspólnych pasm (I-V), które pojawiają się dla wszystkich przebadanych gatunków i odmian. Wszystkie pięć pasm może być rozpatrywane jako chemotaksonomiczne markery dla rodziny *Lamiaceae*. Pasma pierwsze charakteryzuje się najmniejszą intensywnością ( $R_F = 0,03 \pm 0,01$ ) dla gatunku *S. triloba*, natomiast pasmo o największej intensywności charakteryzuje gatunek *D. moldavical* o kwiatostanie niebieskim i białym. Analizując pasmo drugie ( $R_F = 0,10 \pm 0,01$ ) możemy zaobserwować, iż dla dwóch odmian gatunku *D. moldavical* intensywność pasm jest największa, natomiast dla pozostałych czterech gatunków, intensywność jest mniejsza, ale porównywalna między sobą. Pasma III ( $R_F = 0,25 \pm 0,02$ ) jest również najbardziej intensywne dla dwóch odmian gatunku *D. moldavical*, jednak najmniejszą intensywność stwierdzono dla gatunku *S. staminea*. W przypadku pasma IV ( $R_F = 0,51 \pm 0,02$ ) zaobserwowano największą intensywność dla dwóch gatunków szalwii, natomiast dla pozostałych czterech roślin, intensywność jest mniejsza, ale porównywalna między sobą. Dla ostatniego zidentyfikowanego pasma V ( $R_F = 0,61 \pm 0,02$ ) największą intensywność stwierdzono dla gatunku *S. staminea*, natomiast najmniejszą dla gatunku *T. vulgaris*. Dodatkowo zaobserwowano kilka pojedynczych pasm, które różnicują poszczególne gatunki i odmiany roślin (oznaczone na rysunku pojedynczymi elipsami).

Ostatnią omawianą frakcją jest frakcja GFB, dla której zaobserwowano cztery wspólne pasma dla wszystkich przebadanych roślin (rys.11.), dlatego mogą być również rozpatrywane jako chemotaksonomiczne markery. Pasma I ( $R_F = 0,61 \pm 0,02$ ) jak i pasmo II ( $R_F = 0,68 \pm 0,02$ ) największą intensywnością charakteryzuje odpowiednio gatunek *S. triloba* i *T. serpyllum*, natomiast dla pozostałych czterech roślin, intensywność jest mniejsza, ale porównywalna między sobą. Dla pasma III ( $R_F = 0,93 \pm 0,02$ ) największą intensywność stwierdzono dla gatunku *S. staminea*, natomiast najmniejszą dla gatunku

*D. moldavical* o białym kwiatostanie. Ostatnie zaobserwowane pasmo IV ( $R_F = 0,97 \pm 0,02$ ) charakteryzują się największą intensywnością dla gatunku *S. triloba*, natomiast dla pozostałych pięciu roślin, intensywność jest mniejsza, ale porównywalna między sobą. Ponadto na chromatogramach dla gatunków *S. triloba*, *S. staminea*, *T. vulgaris* oraz *T. serpyllum* zaobserwowano dodatkowe pasma o niskich wartościach  $R_F$  (oznaczone na rysunku pojedynczymi elipsami), których nie stwierdzono dla pozostałych dwóch odmian roślin. Dla dwóch odmian (o kwiatostanie niebieskim i białym) gatunku *D. moldavical* zaobserwowano pasma o wysokich wartościach  $R_F = 0,77 \pm 0,02$ , których nie stwierdzono dla pozostałych czterech gatunków. Gatunki *T. vulgaris* oraz *T. serpyllum* charakteryzują się największą ilością oraz największą intensywnością otrzymanych pasm.

Podsumowując, należy zauważyć, że dla dwóch odmian gatunku *D. moldavical* (z kwiatostanem niebieskim i białym) zaobserwowano niemal identyczne chromatogramy, bez względu na to, która z próbek jest analizowana. Jedynym wyjątkiem jest frakcja AF, gdzie drobne różnice pomiędzy tymi dwoma odmianami roślin są nadal zauważalne. Można zatem wywnioskować, że pomimo zastosowania selektywnej ekstrakcji oraz odpowiednich środków do frakcjonowania danej grupy polifenoli, dwie odmiany jednego i tego samego gatunku rośliny są zbyt mocno powiązane, aby móc je odróżnić przy użyciu fingerprintów uzyskanych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Dla pozostałych pięciu frakcji (WKF, KKF, ZKF, GFO oraz GFB) zaobserwowano różnice pomiędzy badanymi gatunkami. Odróżnienie ich zatem przy użyciu otrzymanych fingerprintów jest możliwe.

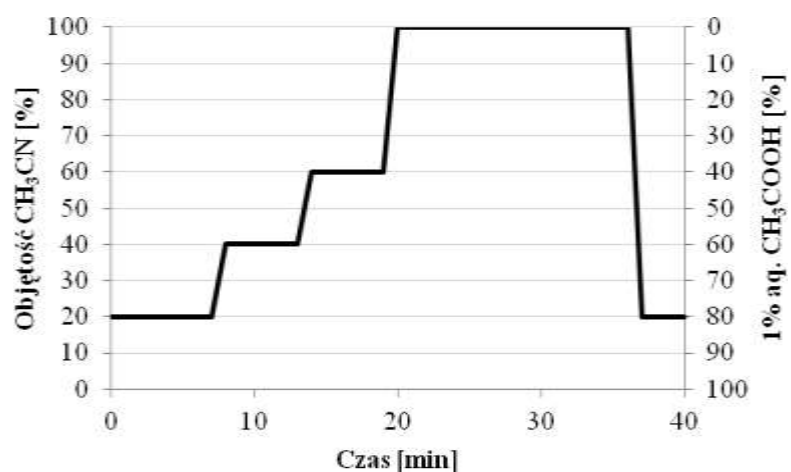
## 4.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Do analizy chromatograficznej poszczególnych frakcji kwasów fenolowych oraz flawonoidów użyto wysokosprawnego chromatografu cieczowego Varian 920-LC składającego się z detektora fotodiodowego (DAD) oraz fotodyspersyjnego detektora laserowego (ELSD). Chromatogramy z zastosowaniem detektora DAD rejestrowano przy długości fali  $\lambda = 254$  nm. Wszystkie otrzymane frakcje związków fenolowych rozdzielano w tym samym układzie chromatograficznym:

- ✓ faza stacjonarna - kolumna RP-18 (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm),
- ✓ faza ruchoma - acetonitryl, woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego,
- ✓ rodzaj elucji - elucja gradientowa,
- ✓ czas analizy - 40 minut.

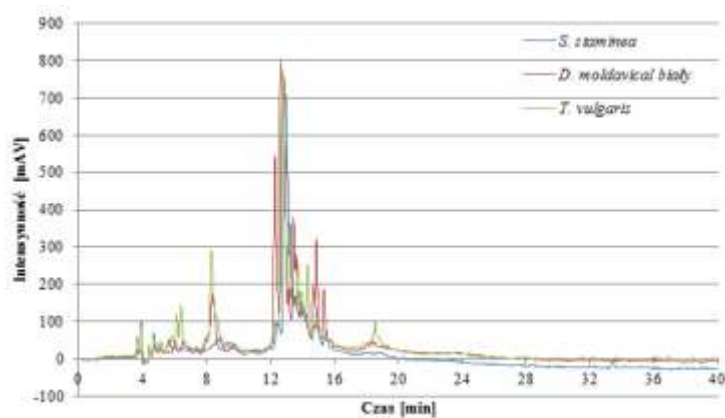
Tab.8. Warunki rozdziału frakcji kwasów fenolowych i flawonoidów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. A - acetonitryl, B - woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego.

Czas [min]	%A	%B
0-7	20%	80%
8-13	40%	60%
14-19	60%	40%
20-36	100%	0%
37-40	20%	80%

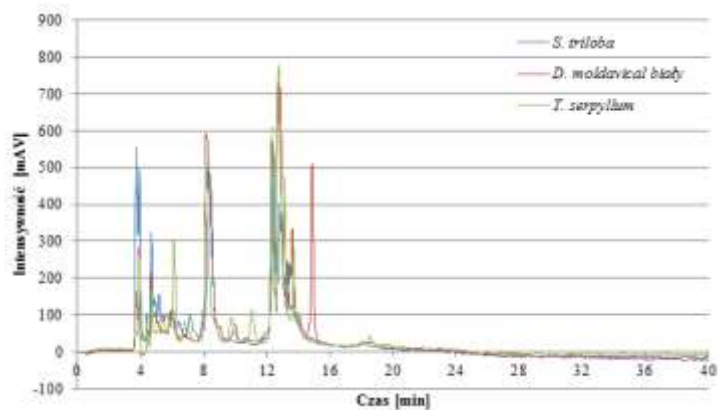


Rys.13. Profil gradientu zastosowany w analizie chromatograficznej frakcji związków fenolowych.

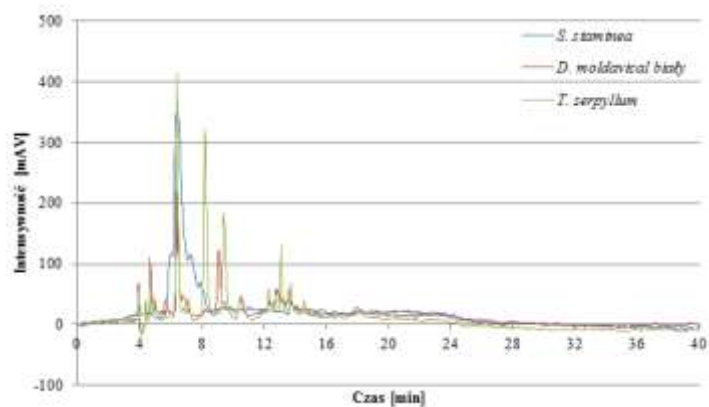
W wyniku przeprowadzonej analizy otrzymano chromatogramy dla wybranych frakcji poszczególnych odmian i gatunków. Poniżej na rysunkach 14-18 przedstawiono chromatogramy uzyskane przy długości fali  $\lambda = 254$  nm przy zastosowaniu detektora DAD, natomiast na rysunkach 19-23 przedstawiono chromatogramy uzyskane przy zastosowaniu detektora ELSD. Na umieszczonych wykresach przedstawiono po jednym przykładzie dla danego gatunku lub odmiany (dla którego zaobserwowano bardziej zróżnicowane chromatogramy), dla pięciu poszczególnych frakcji (wolnych kwasów fenolowych, kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej, kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej, octanowej frakcji glikozydów flawonoidowych oraz butanolowej frakcji glikozydów flawonoidowych).



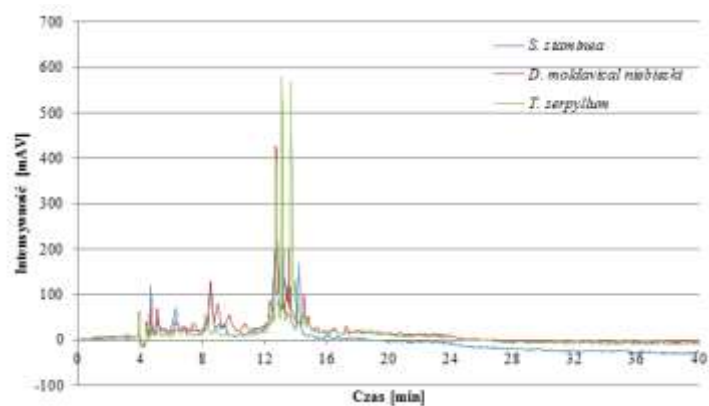
Rys.14. Chromatogram przedstawia octanową frakcję glikozydów flawonoidowych dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy długości fali  $\lambda = 254$  nm przy użyciu detektora DAD.



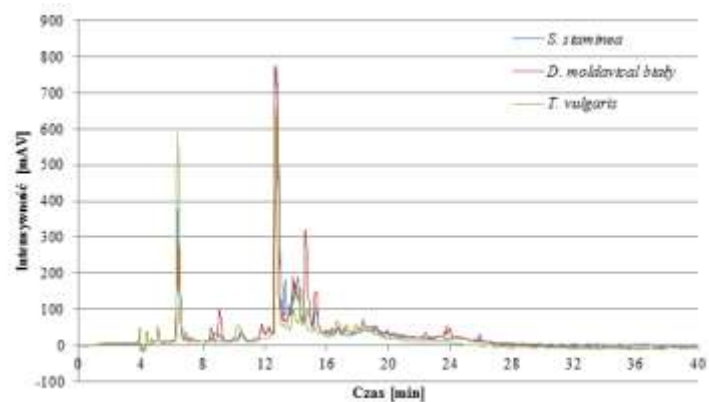
Rys.15. Chromatogram przedstawia butanolową frakcję glikozydów flawonoidowych dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy długości fali  $\lambda = 254$  nm przy użyciu detektora DAD.



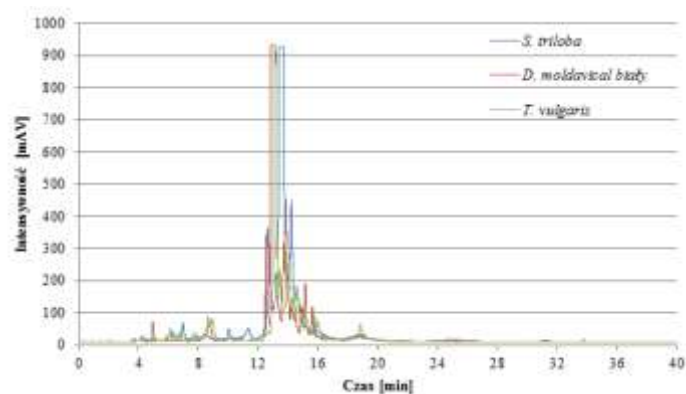
Rys.16. Chromatogram przedstawia frakcję kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy długości fali  $\lambda = 254$  nm przy użyciu detektora DAD.



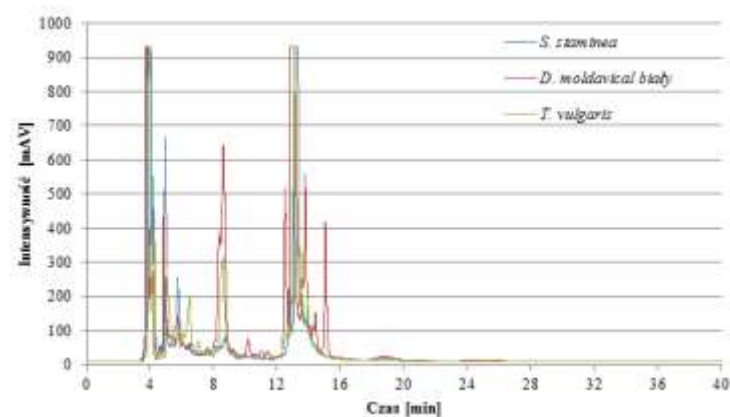
Rys.17. Chromatogram przedstawia frakcję kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy długości fali  $\lambda = 254$  nm przy użyciu detektora DAD.



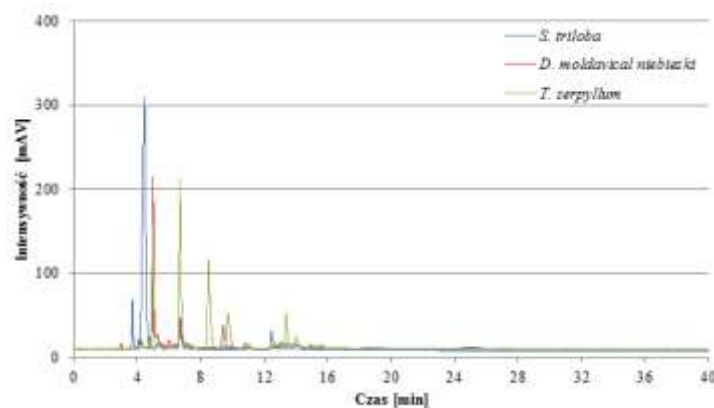
Rys.18. Chromatogram przedstawia frakcję wolnych kwasów fenolowych dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy długości fali  $\lambda = 254$  nm przy użyciu detektora DAD.



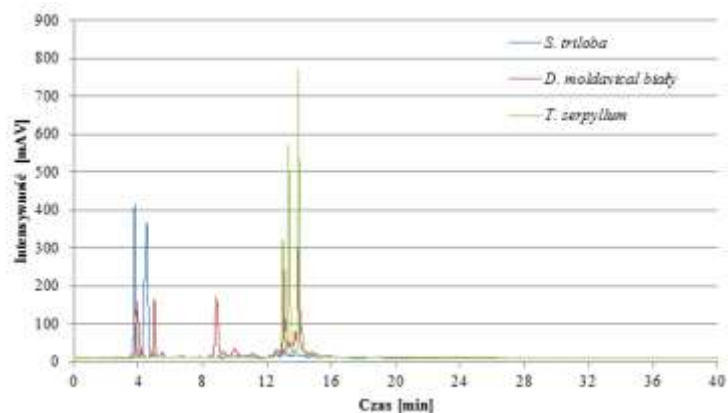
Rys.19. Chromatogram przedstawia octanową frakcję glikozydów flawonoidowych dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy użyciu detektora ELSD.



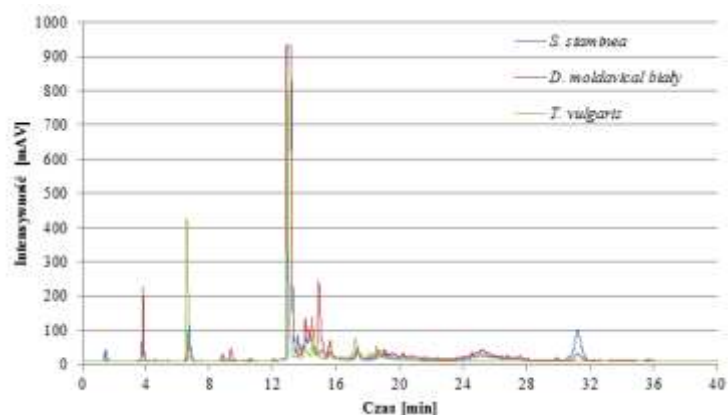
Rys.20. Chromatogram przedstawia butanolową frakcję glikozydów flawonoidowych dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy użyciu detektora ELSD.



Rys.21. Chromatogram przedstawia frakcję kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy użyciu detektora ELSD.



Rys.22. Chromatogram przedstawia frakcję kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy użyciu detektora ELSD.



Rys.23. Chromatogram przedstawia frakcję wolnych kwasów fenolowych dla trzech analizowanych gatunków i odmian. Rejestracja chromatogramu przy użyciu detektora ELSD.

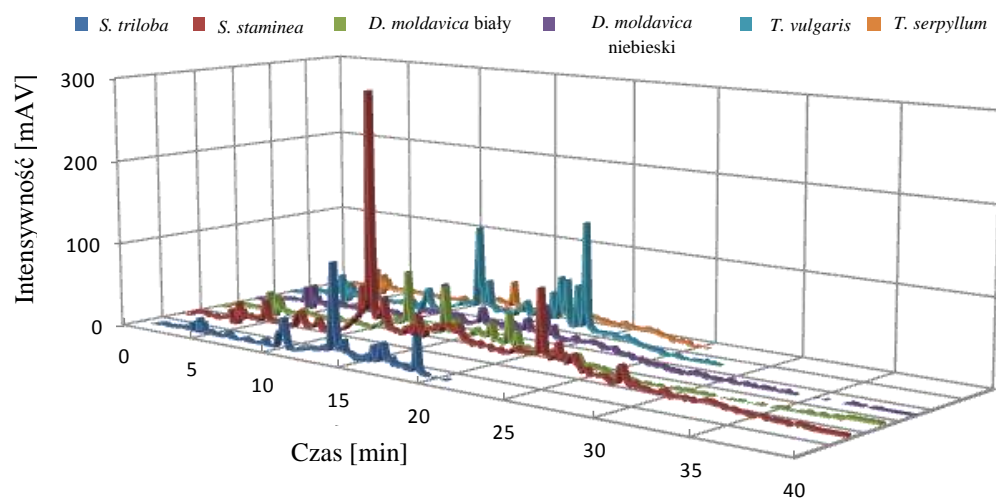
Porównując chromatogramy uzyskane przy użyciu detektora fotodiodowego oraz fotodyspersyjnego detektora laserowego stwierdzono, iż większą ilość rozdzielonych pików zarejestrowano w przypadku zastosowania detektora DAD. Z kolei w większości przypadków intensywność pików jest większa przy zastosowaniu detektora ELSD.

Analizując chromatogramy uzyskane przy użyciu detektora ELSD zaobserwowano, że na większości z nich intensywność pojedynczych pików wykracza poza skalę. Jest to spowodowane zbyt dużym stężeniem substancji w próbce. Problem ten można rozwiązać na dwa sposoby. Pierwszym z nich jest rozcieńczenie, a drugim zmniejszenie ilości aplikowanej próbki. Niemniej jednak w obu przypadkach istnieje prawdopodobieństwo utraty części pików o najmniejszej intensywności, które mogą być charakterystyczne dla danego gatunku i odmiany.

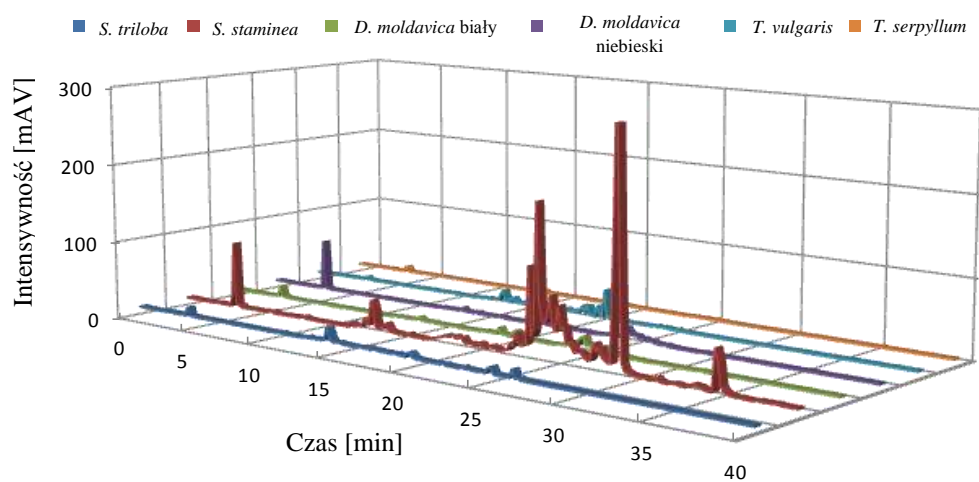


Analizując uzyskane chromatogramy dla sześciu badanych roślin zaobserwowano, że najbardziej interesującą frakcją okazała się frakcja aglikonów flawonoidowych. Dlatego w poniższym omówieniu uwagę skupiono tylko na tej frakcji. Na rysunku 24 przedstawiono wykresy dla wszystkich sześciu gatunków i odmian zarówno przy zastosowaniu detektora DAD przy długości fali  $\lambda = 254$  nm jak i detektora ELSD. Dodatkowe cechy otrzymanych chromatogramów znajdują się w tabeli 9 i 10.

a)



b)



Rys.24. Porównanie chromatogramów frakcji aglikonów flawonoidowych dla sześciu przebadanych roślin za pomocą techniki HPLC przy zastosowaniu a) detektora DAD przy długości fali  $\lambda = 254$  nm oraz b) detektora ELSD.

Na chromatogramach zarejestrowanych przy użyciu detektora DAD przy długości fali  $\lambda = 254$  nm dla frakcji AF (rys.24a.) zaobserwowano jeden wspólny pik dla wszystkich gatunków i odmian przy czasie retencji równym  $t_R = 13,85$  min. Dla roślin należących do gatunku szalwii wspomniany pik charakteryzują się największą wartością odpowiedniego pola powierzchni, które wynosi dla gatunku *S. staminea* 77,1 mAV x min, natomiast dla gatunku *S. triloba* 31,7 mAV x min. Dla pozostałych roślin wartości pól powierzchni są niższe. Podobną zależność możemy zaobserwować analizując procentowy udział powierzchni tego piku do całkowitej wartości chromatogramów. W tym przypadku odpowiednie udziały dla gatunków *S. staminea* i *S. triloba* wynoszą odpowiednio 26,5 i 19,8% (tab.9.). Dla pozostałych roślin odpowiednie udziały są niższe. Analizując chromatogramy otrzymane przy zastosowaniu detektora ELSD dla frakcji AF nie stwierdzono żadnych wspólnych pików dla sześciu badanych roślin (rys.24b.).

Tab.9. Porównanie odpowiednich wartości uzyskanych dla wspólnego piku chromatograficznego frakcji aglikonów flawonoidowych dla sześciu przebadanych roślin z zastosowaniem detektora DAD przy długości fali  $\lambda = 254$  nm.

Gatunek i odmiana	Czas retencji $t_R$ [min]	Pole powierzchni [mAV x min]	Udział procentowy [%]
<i>S. triloba</i>	13,85	31,7	19,8
<i>S. staminea</i>		77,1	26,5
<i>D. moldavica</i> (biały)		16,7	11,0
<i>D. moldavica</i> (niebieski)		11,3	8,4
<i>T. vulgaris</i>		27,0	13,5
<i>T. serpyllum</i>		6,5	7,5

Każdy sygnał odpowiada 40 mg suchej masy roślinnej.

Dodatkowo analiza uzyskanych chromatogramów zarejestrowanych z zastosowaniem detektora DAD i ELSD dla frakcji AF została przedstawiona w tabeli 10. Okazuje się, że przy zastosowaniu detektora DAD zaobserwowano trzy piki, które są charakterystyczne dla określonych grup roślin. Pierwszy z nich przy czasie retencji  $t_R = 16,38$  min zaobserwowano dla dwóch odmian gatunku *D. moldavica* (z kwiatostanem białym i niebieskim). Kolejny pik przy czasie retencji  $t_R = 20,48$  min należy również do dwóch odmian gatunku *D. moldavica* (z kwiatostanem białym i niebieskim), ale zarejestrowano go również dla gatunku *T. vulgaris*. Ostatni, trzeci pik zaobserwowano tylko dla gatunku *S. staminea* ( $t_R = 24,80$  min).

Analiza chromatogramów uzyskanych przy zastosowaniu detektora ELSD dla frakcji AF również pozwoliła na zaobserwowanie trzech pików charakterystycznych dla odpowiednich gatunków i odmian. Jednak uzyskane wartości czasów retencji różnią się od wartości czasów retencji uzyskanych przy zastosowaniu detektora DAD. Pierwszy z nich przy czasie retencji  $t_R = 3,80$  min zaobserwowano dla dwóch gatunków szalwii *S. staminea* oraz *S. triloba* oraz dla dwóch odmian gatunku *D. moldavica* (z kwiatostanem białym i niebieskim). Kolejny pik przy czasie retencji  $t_R = 14,13$  min należy również do dwóch gatunków szalwii oraz dwóch gatunków tymianku. Ostatni, trzeci pik zaobserwowano tylko dla gatunku *S. staminea* ( $t_R = 29,89$  min).

Tab.10. Porównanie charakterystycznych pików wraz z ich wartościami pól powierzchni dla frakcji AF dla sześciu przebadanych roślin z zastosowaniu dwóch detektorów (DAD i ELSD).

<b>DAD</b>		
<b>Czas retencji, <math>t_R</math> [min]</b>	<b>Gatunek i odmiana</b>	<b>Pole powierzchni [mAV x min]</b>
16,38	<i>D. moldavica</i> (biały)	14,7
	<i>D. moldavica</i> (niebieski)	3,6
20,48	<i>D. moldavica</i> (biały)	8,3
	<i>D. moldavica</i> (niebieski)	7,5
	<i>T. vulgaris</i>	10,4
24,80	<i>S. staminea</i>	14,4
<b>ELSD</b>		
<b>Czas retencji, <math>t_R</math> [min]</b>	<b>Gatunek i odmiana</b>	<b>Pole powierzchni [mAV x min]</b>
3,80	<i>S. triloba</i>	1,9
	<i>S. staminea</i>	31,3
	<i>D. moldavica</i> (biały)	4,7
	<i>D. moldavica</i> (niebieski)	6,2
14,13	<i>S. triloba</i>	5,7
	<i>S. staminea</i>	16,8
	<i>T. vulgaris</i>	5,2
	<i>T. serpyllum</i>	0,7
29,89	<i>S. staminea</i>	66,3

Każdy sygnał odpowiada 40 mg suchej masy roślinnej.

Dla wyników analizy czterech frakcji (WKF, KKF, GFO oraz GFB) z zastosowaniem detektora DAD zaobserwowano bardzo zbliżone wyniki, co powoduje, że rozróżnienie sześciu badanych roślin na tej podstawie jest niemożliwe. Dla frakcji kwasów fenolowych, uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej, na uzyskanych chromatogramach widać pewne różnice pomiędzy gatunkami i odmianami, jednak w porównaniu z frakcją AF, są one duże mniejsze. Dlatego frakcje AF można uznać za chromatograficzny marker dla roślin blisko ze sobą spokrewnionych. Najmniejsze różnice dla frakcji AF zaobserwowano dla *D. moldavica* o kwiatostanie białym i niebieskim, co jest zrozumiałe, ponieważ są to dwie odmiany tego samego gatunku.

Bardzo podobne wyniki zaobserwowano dla sześciu frakcji uzyskanych z zastosowaniem detektora ELSD. W tym przypadku chromatogramy trzech frakcji (WKF, GFO i GFB) wykazały zbliżone wyniki, co nie daje nam możliwości rozróżnienia poszczególnych gatunków i odmian. Dla frakcji KKF oraz ZKF zaobserwowano pewne różnice dla poszczególnych roślin, jednak w porównaniu z frakcją AF, są one dużo mniejsze. Również w tym przypadku najmniejsze różnice dla frakcji AF zaobserwowano dla *D. moldavica* o kwiatostanie białym i niebieskim, co jest zrozumiałe, ponieważ są to dwie odmiany tego samego gatunku.

Wyniki otrzymane techniką HPLC potwierdzają otrzymane wcześniej rezultaty techniką TLC. Stwierdzono, że frakcja aglikonów flawonoidowych najlepiej różnicuje badane rośliny, dlatego może być uważana za chromatograficzny marker rozróżniający rośliny należące do rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*).

## 5. Analiza lotnej frakcji wybranych gatunków tymianku

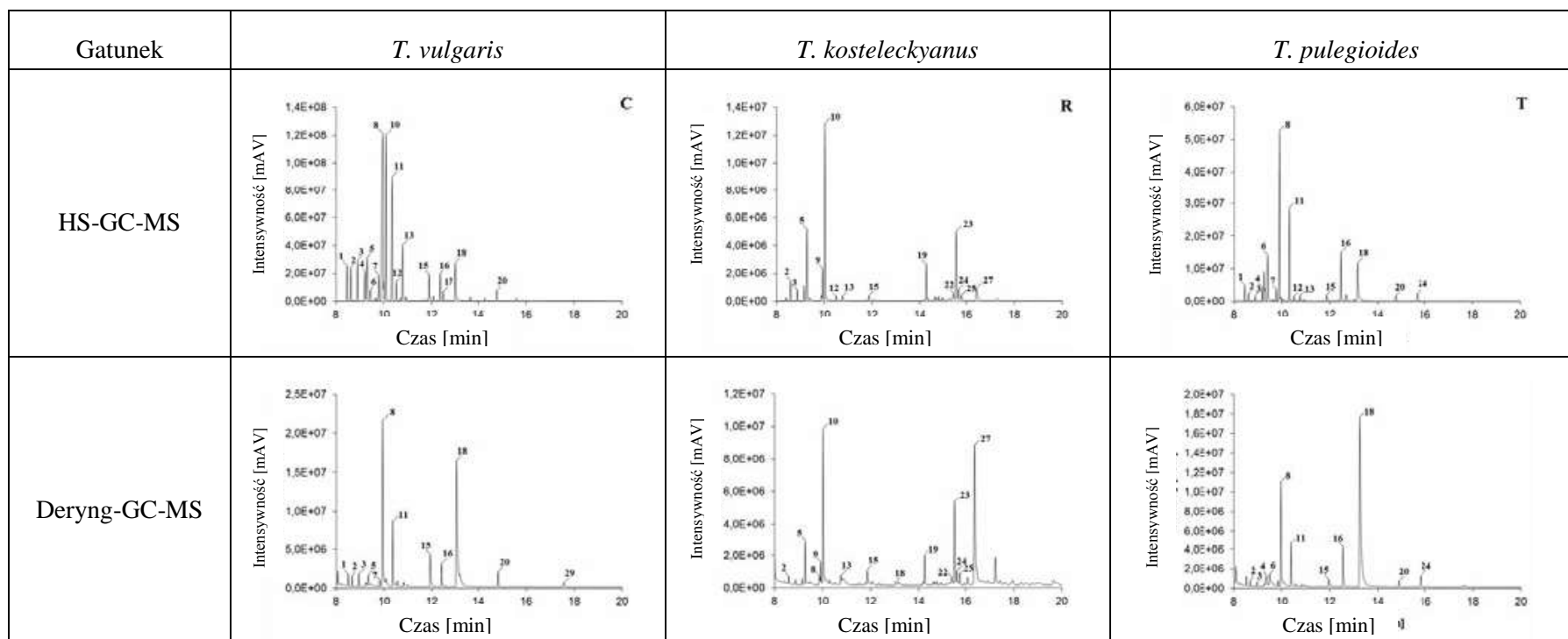
Analizę GC-MS oraz HS-GC-MS przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Trace 2000 sprzężonego ze spektrometrem mas MS Trace i wyposażonego w automatyczny podajnik próbek. Uzyskane dane rejestrowano i opracowywano przy pomocy programu X-Calibur.

Tab.11. Warunki pracy chromatografu gazowego.

model aparatu	chromatograf gazowy Trace 2000
kolumna kapilarna	RTX-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m
gaz nośny	hel o ciśnieniu p = 100 kPa
program temperatury	40°C (3 min); 40-250°C (8°C/min)
warunki izotermiczne	250°C (15 min)
temperatura dozownika	200°C
energia jonizacji	70 eV
temperatura interfejsu	220°C
temperatura źródła jonów	200°C
całkowity czas analizy	30 min

Identyfikacja poszczególnych związków lotnych opierała się na porównaniu widm masowych zarejestrowanych dla poszczególnych pików chromatograficznych z dostępnymi w bibliotece widm NIST (ang. *National Institute of Standards and Technology*), która działała kompatybilnie z programem X-Calibur. Identyfikacja dwóch par izomerów strukturalnych (o-cymenu i m-cymenu oraz tymolu i karwakrolu) na podstawie biblioteki widm jest niejednoznaczna, dlatego w omówieniu sugerowano dwie możliwości (i/lub). W tabeli 9 przedstawiono wszystkie 29 zidentyfikowanych związków.

W pierwszym etapie badań na przykładzie trzech gatunków tymianku: *T. vulgaris* (C), *T. pulegioides* (T) oraz *T. kosteleckyanus* (R) porównano efektywność dwóch zastosowanych technik wyodrębniania związków lotnych z materiału roślinnego. W przypadku pierwszej metody frakcję związków lotnych wyodrębniono w procesie destylacji z parą wodną w aparacie Derynga, a uzyskany olejek eteryczny analizowano techniką GC-MS. W przypadku drugiej metody analizowano skład fazy nadpowierzchniowej techniką HS-GC-MS. Otrzymane chromatogramy przedstawia rysunek 25.



Rys.25. Porównanie chromatogramów lotnej frakcji dla trzech wybranych gatunków tymianku przy zastosowaniu dwóch typów ekstrakcji.  
Symbole gatunków oraz związków opisane jak w tabeli 12.

Porównując dwa chromatogramy dla gatunku *T. vulgaris* (C) możemy zaobserwować pewne zależności. Przy pomocy techniki HS-GC-MS zidentyfikowanych zostało 19 lotnych związków. Największą intensywnością charakteryzowały się piki należące do mieszaniny izomerów o-cymen i/lub m-cymen (pik nr 8) oraz eukaliptolu (pik nr 10). Analizując olejki otrzymane za pomocą destylacji z parą wodną w aparacie Derynga i analizowane techniką GC-MS zidentyfikowano tylko 12 lotnych związków, a największą intensywność wykazał pik nr 8 (c-cymen i/lub m-cymen). Dodatkowe związki zidentyfikowane przy zastosowaniu metody HS-GC-MS to: 1-okten-3ol (pik nr 4), 3-oktanol (pik nr 6), eukaliptol (pik nr 10),  $\beta$ -terpineol (pik nr 12),  $\beta$ -linalol (pik nr 13), linalin antranilanu (pik nr 17),  $\beta$ -bourbon (pik nr 19) oraz germakren D (pik nr 23). Natomiast związek, który został zidentyfikowany w oleju otrzymanym w aparacie Derynga to tlenek kariofilenu (pik nr 29).

Analizując dwa chromatogramy otrzymane dla gatunku *T. kosteleckyanus* (R) zaobserwowano również, że techniką HS-GC-MS zidentyfikowano więcej związków lotnych - 16, niż przy pomocy Deryng-GC-MS - tylko 14. W przypadku pierwszej metody najintensywniejszy pik zarejestrowano dla pik nr 10 (eukaliptol), natomiast w drugim przypadku dla pików nr 10 (eukaliptol) oraz 27 (nerolidol). Przy użyciu techniki HS-GS-MS dodatkowo zidentyfikowano 4 związki: kamfen, 3-oktanol,  $\tau$ -terpinen oraz  $\beta$ -terpineol (odpowiednio nr pik 3, 6, 11 i 12). Związki o-cymen i/lub m-cymen (nr 8) oraz karwakrol i/lub tymol (nr 18), zostały zidentyfikowane tylko w oleju eterycznym otrzymanym za pomocą destylacji z parą wodną w aparacie Derynga.

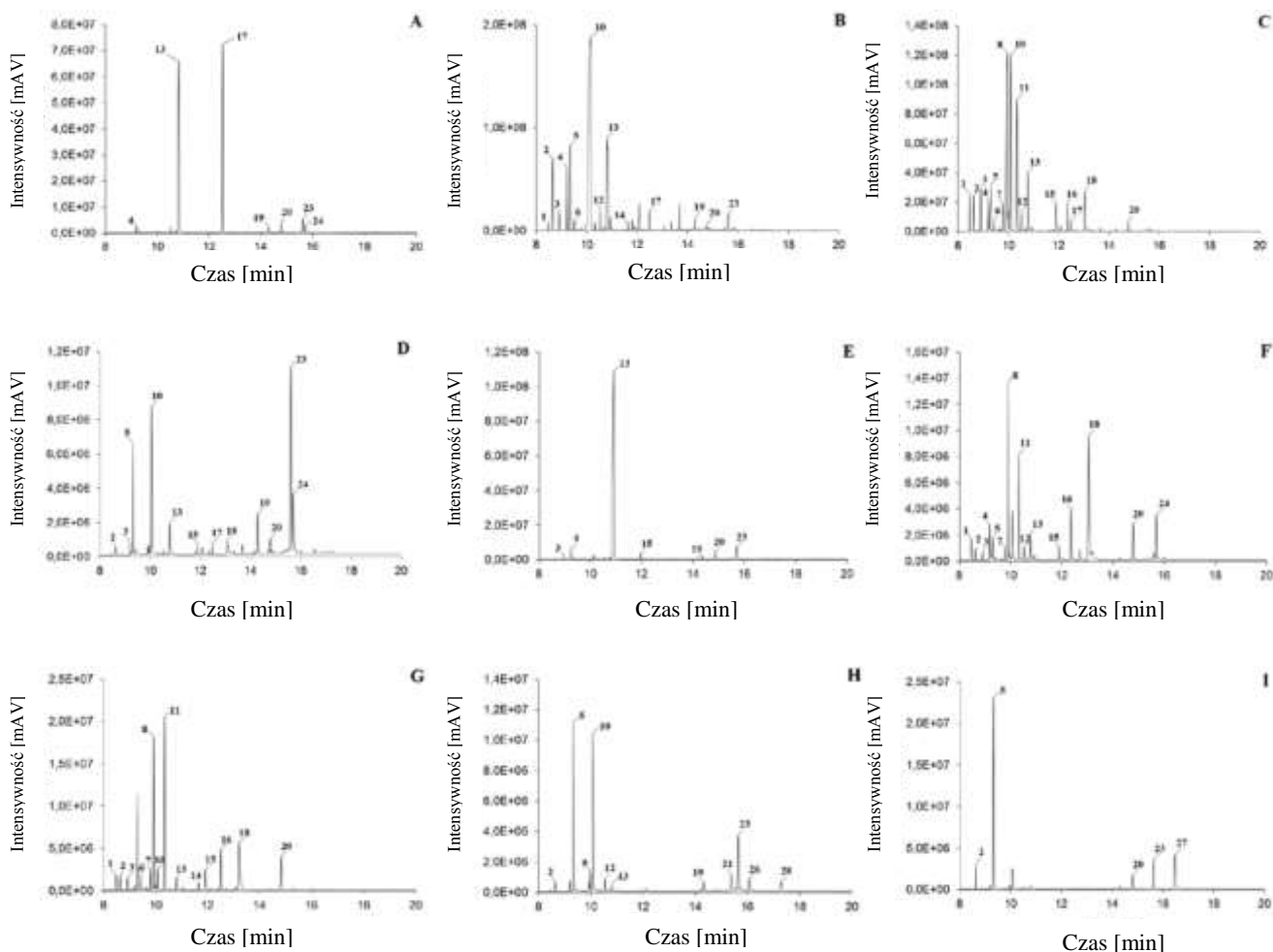
Dla chromatogramów uzyskanych dla ostatniego analizowanego gatunku *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* (T) stosując technikę Deryng-GC-MS zidentyfikowano 11 związków lotnych, natomiast przy zastosowaniu techniki HS-GC-MS cztery dodatkowe związki: 3-tujen (nr 1),  $\alpha$ -terpinen (nr 7),  $\beta$ -terpineol (pik nr 12) oraz  $\beta$ -linalol (pik nr 13).

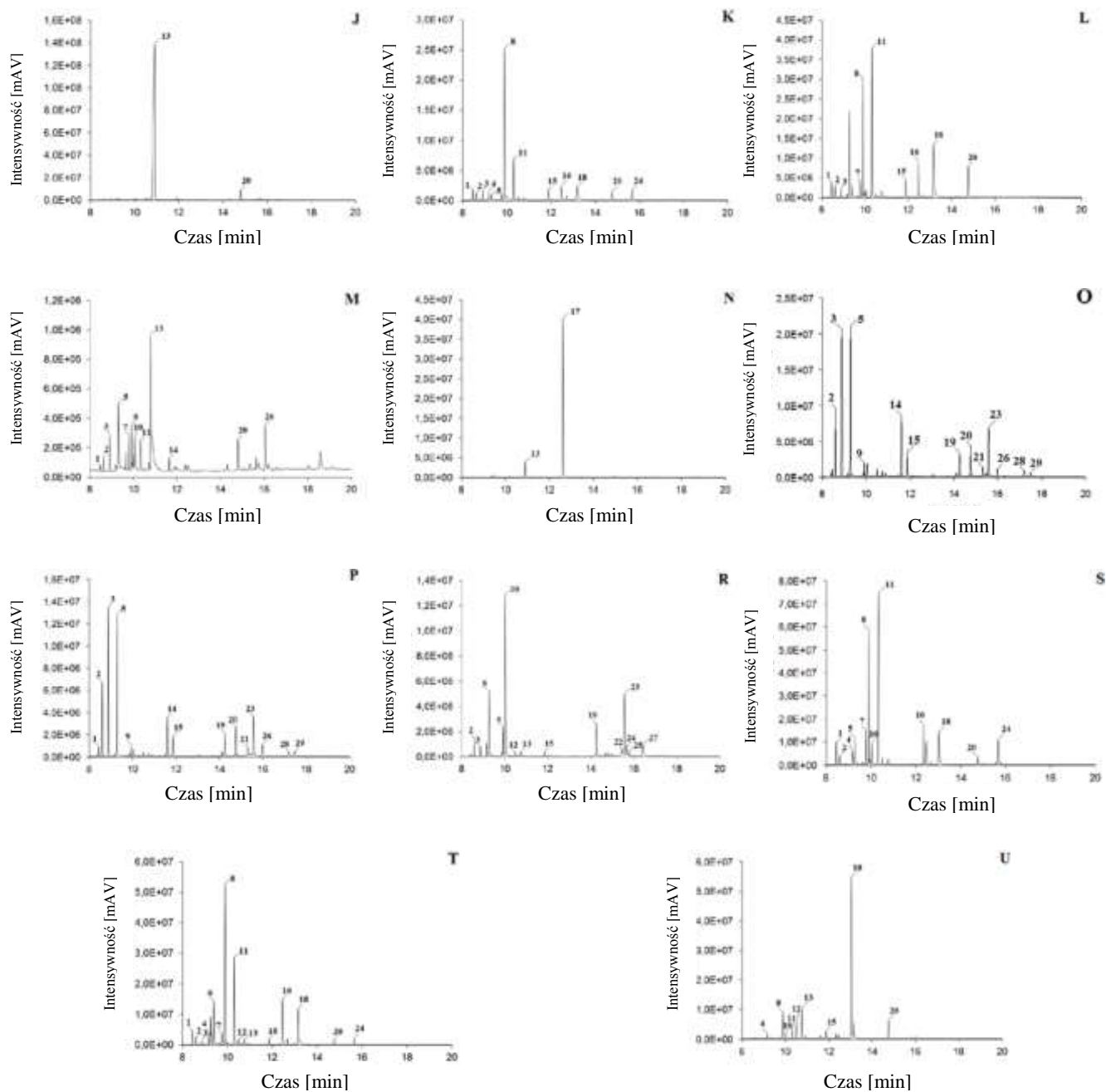
Dla wszystkich trzech przebadanych gatunków tymianku techniką HS-GC-MS zidentyfikowano więcej związków lotnych niż w przypadku olejków eterycznych otrzymanych w wyniku destylacji z parą wodną w aparacie Derynga analizowanych techniką GC-MS. Niemniej jednak dla gatunków *T. vulgaris* (C) oraz *T. kosteleckyanus* (R) zaobserwowano związki, które zostały zidentyfikowane tylko dla olejków eterycznych analizowanych techniką GC-MS.

Porównując efektywność dwóch zastosowanych technik analiza HS-GC-MS okazała się techniką szybszą i bardziej wydajną (pozwala zidentyfikować większą liczbę związków lotnych). Niemniej jednak, techniki te uzupełniają się, dlatego warto wykonywać je jednocześnie w celu uzyskania kompletnej informacji dotyczącej składu chemicznego frakcji lotnej.



W drugim etapie badań przeanalizowano chromatogramy uzyskane techniką HS-GC-MS dla osiemnastu gatunków tymianku. W tabeli 12 przedstawiono wyniki analiz frakcji lotnej za pomocą techniki HS-GC-MS dla wszystkich przebadanych próbek. Możemy zatem porównać te rośliny ze względu na liczbę i rodzaj zidentyfikowanych związków chemicznych. Dodatkowo możliwa jest również analiza ilościowa. Przedstawiona jest jako wkład procentowy poszczególnych wysokości pików do sumy wszystkich pików uzyskanych w danym chromatogramie. Na rysunku 26 przedstawiono wszystkie chromatogramy otrzymane w wyniku omawianej analizy.





Rys.26. Porównanie wszystkich chromatogramów uzyskanych w wyniku analizy HS-GC-MS.  
Symbole gatunków oraz związków opisane jak w tabeli 12.

W wyniku porównania chromatogramów uzyskanych dla gatunku *T. vulgaris* (C i U) zauważono pewne różnice w składzie frakcji lotnej. Materiał roślinny pochodzący z Ogrodu Botanicznego (próbka C) zawierający zarówno łodygi i liście charakteryzuje obecność linalinu, antranilanu oraz germakrenu D, których nie zaobserwowano w przypadku próbki U. W próbce U (dostępnej komercyjnie) wykryto: kamforę,  $\beta$ -bisabolen,  $\tau$ -muurolen i/lub  $\tau$ -kadinen oraz tlenek kariofilenu, które nie są obecne w próbce C. Analizując piki chromatograficzne dla tych dwóch próbek, różnice są zauważalne. Najbardziej intensywny pik dla próbki pochodzącej z Ogrodu Botanicznego należy do mieszaniny izomerów m-cymenu i/lub o-cymenu (nr 8) oraz eukaliptolu (nr 10), natomiast dla próbki dostępnej komercyjnie dla mieszaniny izomerów karwakrolu i/lub tymolu (nr 18). Porównując pik nr 18 dla gatunku *T. vulgaris* możemy zaobserwować, że dla próbki U jest on dwukrotnie wyższy niż w przypadku próbki C. Pomimo opisanych różnic ilościowych i jakościowych, obydwie próbki wykazują pewne podobieństwo.

Porównanie chromatogramów otrzymanych dla gatunku *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* (próbka F i T) pokazuje, iż różnią się one między sobą składem frakcji lotnej. Dla gatunku *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* użytkowy (próbka F) zidentyfikowano takie związki jak:  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -bourbon,  $\tau$ -muurolen i/lub  $\tau$ -kadinen i tlenek kariofilenu, których nie zaobserwowano dla próbki T (*T. pulegioides* subsp. *pulegioides* *alpinarium*). Jednakże, różnice w intensywności pików dla obu badanych próbek nie są tak silnie wyraźne jak w poprzednio omawianym przypadku.

Dla kolejnych dwóch próbek - gatunku *T. citriodorus* 'golden dwarf' (próbka G i O), również zaobserwowano różnice w składzie frakcji lotnej. Dla próbki G (liście i łodygi) zidentyfikowano 6 dodatkowych związków (3-oktanol,  $\alpha$ -terpinen, mieszanina izomerów: o-cymen i/lub m-cymen, eukaliptol, 2-izopropyl-5-metyloanizol oraz mieszanina izomerów: karwakrol i/lub tymol), których nie zaobserwowano dla próbki O (korzeń). Natomiast dla próbki, składającej się z korzenia zidentyfikowano:  $\beta$ -pinen, limonen, farnezen, germakren D, germakren D 4-ol i tlenek kariofilenu, których obecności nie stwierdzono w próbce składającej się z liści i łodygi. Dla próbki G najbardziej intensywny pik zarejestrowano dla mieszaniny izomerów: o-cymen i/lub m-cymen oraz  $\tau$ -terpinenu, natomiast dla próbki O dla kamfenu i  $\beta$ -pinenu. Pomimo oczywistych różnic ilościowych i jakościowych (głównie dlatego, że analizowane były różne części rośliny), chromatogramy wykazały znaczne podobieństwo.

Analizując chromatogramy dla gatunku *T. serpyllum* (próbki A i P) oraz dla dwóch odmian tego gatunku: *T. serpyllum* *albus* (próbka B) oraz *T. serpyllum* *aureus* (próbka L), zaobserwowano różnice w składzie frakcji lotnej. Okazało się, że dwie pierwsze próbki (A i P) całkowicie różnią się między sobą. Tylko pięć składników olejków eterycznych jest wspólnych dla nich:  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -linalol,  $\beta$ -bourbon, kariofilen oraz germakren D. Następnie

porównano dwie odmiany tego samego gatunku. W próbce B (*T. serpyllum* albus) zidentyfikowano  $\beta$ -pinen, kamforę, linalin antranilanu, farnezen, germakren D oraz  $\tau$ -elemen, których obecności nie stwierdzono w próbce L (*T. serpyllum* aureus). Natomiast w próbce L wykryto mieszaninę izomerów: o-cymen i/lub p-cymen, karwakrol i/lub tymol oraz  $\tau$ -muurolen i/lub  $\tau$ -kadinen, których nie zaobserwowano dla próbki B. Dla wszystkich czterech próbek stwierdzono różnice ilościowe i jakościowe, co ma wpływ na późniejszą klasyfikację chemometryczną tych gatunków i odmian.

Analiza wszystkich przeanalizowanych próbek pozwoliła stwierdzić, iż zidentyfikowano tylko jeden związek wspólny dla wszystkich przebadanych gatunków tymianku. Związkiem tym jest  $\beta$ -linalol. Mieszanina izomerów: tymol i/lub karwakrol pojawia się tylko w 10 z 20 badanych próbek. Wyniki te są zaskakujące, ponieważ głównym składnikiem olejku eterycznego dla tego gatunku jest tymol.

Tab.12. Zidentyfikowane związki w poszczególnych gatunkach tymianku wraz z ich charakterystycznymi właściwościami.

Związek lotny	3-tujen	$\alpha$ -pinen	kamfen	1-okten-3-ol	$\beta$ -pinen	3-oktanol	$\alpha$ -terpinen	o-cymen i/lub m-cymen	limonen	eukaliptol	$\tau$ -terpinen	$\beta$ -terpinol	$\beta$ -linalol	kamfora	borneol	
Lp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
$t_R$ [min]	8,46	8,62	8,90	9,19	9,31	9,41	9,78	9,92	9,95	10,06	10,33	10,52	10,80	11,62	11,90	
Symbol	Gatunki	Wkład względny [%]														
A	<i>T. serpyllum</i>	NZ <sup>a</sup>	NZ	NZ	1,49	0,47	0,30	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	36,39	NZ	NZ
B	<i>T. serpyllum</i> albus użytkowy	0,90	9,34	2,18	8,20	11,10	1,31	0,31	NZ	NZ	25,2	0,93	2,82	11,93	1,02	0,46
C	<i>T. vulgaris</i> użytkowy	3,79	3,60	4,40	3,15	4,67	1,23	2,81	17,96	NZ	17,9	13,41	2,1	6,02	NZ	2,84
D	<i>T. austriacus</i> arboretum	NZ	0,76	0,12	NZ	9,92	0,68	NZ	NZ	0,94	13,2	0,17	0,37	2,78	NZ	0,93
E	<i>T. pseudolanuginosus</i> arboretum	NZ	0,34	1,34	3,91	0,63	0,31	NZ	NZ	NZ	NZ	0,14	NZ	65,21	NZ	2,00
F	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i> użytkowy	2,17	1,11	0,72	3,59	2,28	0,30	1,44	18,03	NZ	NZ	10,78	1,29	2,70	NZ	1,48
G	<i>T. citrodorus</i> 'golden dwarf' ziele	1,96	1,65	1,55	NZ	NZ	1,89	2,44	18,25	NZ	2,61	20,56	0,22	1,51	0,80	2,50
H	<i>T. pannonicus</i> alpinarium	NZ	1,24	NZ	NZ	22,31	NZ	0,16	NZ	2,66	20,9	0,29	1,64	1,03	NZ	NZ
I	<i>T. tiflisiensis</i> użytkowy	NZ	5,67	0,27	NZ	42,22	NZ	NZ	NZ	0,90	NZ	0,12	0,48	0,85	NZ	0,16
J	<i>T. degenii</i> śródziemnomorski	NZ	0,71	1,20	1,28	0,52	0,23	NZ	0,34	NZ	1,00	0,24	NZ	76,46	NZ	1,45
K	<i>T. alpestris</i> alpinarium	2,46	1,71	2,14	1,82	1,30	0,11	1,44	33,76	NZ	NZ	9,15	0,65	0,49	NZ	2,44
L	<i>T. serpyllum</i> aureus arboretum	2,32	1,66	1,40	NZ	NZ	1,98	2,53	18,05	NZ	1,12	22,63	0,59	0,99	NZ	2,69
M	<i>T. praecox</i> pygmaeus	0,17	0,41	1,05	NZ	1,90	NZ	0,97	1,25	NZ	0,91	0,86	NZ	3,78	0,37	0,13
N	<i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i> alpinarium	NZ	NZ	NZ	NZ	0,95	0,13	NZ	NZ	NZ	0,71	NZ	NZ	5,93	NZ	NZ
O	<i>T. citrodorus</i> 'golden dwarf' korzeń	NZ	8,85	19,04	NZ	19,35	NZ	NZ	NZ	1,75	NZ	0,19	1,14	0,69	7,98	3,24
P	<i>T. serpyllum</i> arboretum	1,21	9,45	19,00	NZ	18,18	NZ	0,12	NZ	1,48	NZ	0,20	0,58	0,38	5,02	2,61
R	<i>T. kosteleckyanus</i> śródziemnomorski	NZ	2,56	1,43	NZ	9,33	0,34	NZ	NZ	4,18	23,4	0,13	0,57	0,60	NZ	0,67
S	<i>T. marshallianus</i> alpinarium	3,58	1,39	0,24	2,17	4,09	0,33	5,34	21,02	NZ	3,36	26,79	1,12	0,88	NZ	NZ
T	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i> alpinarium	2,72	1,36	0,87	2,45	NZ	7,85	2,10	29,59	NZ	NZ	16,03	0,87	0,96	NZ	1,02
U	<i>T. vulgaris</i> komercyjny <sup>b</sup>	0,35	0,38	0,22	1,64	0,56	0,26	0,44	6,86	NZ	1,79	2,63	4,31	7,88	0,78	2,01

	Związek lotny	2-izopropyl- 5- metyloanizol	linalin antranilanu	karwakrol i/lub tymol	β-bourbon	kariofilen	aromadendren	farnezen	germakren D	β-bisabolen	τ-klonen	τ-muurolen i/lub τ-kadinen	nerolidol	germakren D 4-ol	tlonek kariofilenu
Lp.		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
$t_R$ [min]		12,40	12,50	13,12	14,28	14,79	15,33	15,49	15,62	15,71	15,82	16,04	16,50	17,23	17,51
Symbol	Gatunki	Wkład względny [%]													
A	<i>T. serpyllum</i>	NZ <sup>a</sup>	40,11	NZ	1,30	2,51	NZ	NZ	3,04	1,44	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
B	<i>T. serpyllum</i> albus użytkowy	NZ	2,52	NZ	1,65	0,83	NZ	0,32	2,18	NZ	0,40	NZ	NZ	NZ	NZ
C	<i>T. vulgaris</i> użytkowy	2,96	1,04	4,08	0,27	1,13	NZ	NZ	0,27	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
D	<i>T. austriacus</i> arboretum	NZ	1,1	1,34	3,65	1,39	NZ	NZ	16,64	5,32	NZ	0,36	NZ	0,27	NZ
E	<i>T. pseudolanuginosus</i> arboretum	NZ	NZ	NZ	0,97	2,72	NZ	0,19	4,29	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
F	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i> użytkowy	5,22	NZ	12,60	0,27	3,70	NZ	NZ	NZ	4,62	NZ	0,32	NZ	NZ	0,13
G	<i>T. citrodorus</i> 'golden dwarf' ziele	4,86	NZ	5,57	0,18	4,07	0,27	NZ	NZ	NZ	NZ	0,22	NZ	NZ	NZ
H	<i>T. pannonicus</i> alpinarium	NZ	NZ	NZ	1,20	0,25	2,22	0,49	7,40	NZ	NZ	1,66	NZ	1,28	NZ
I	<i>T. tiflisiensis</i> użytkowy	NZ	NZ	NZ	0,64	3,03	NZ	NZ	6,59	NZ	NZ	0,11	7,56	0,15	0,14
J	<i>T. degenii</i> śródziemnomorski	NZ	NZ	NZ	0,33	4,99	NZ	NZ	0,69	1,12	0,10	NZ	0,22	NZ	NZ
K	<i>T. alpestris</i> alpinarium	3,15	NZ	3,00	0,14	1,94	NZ	NZ	NZ	2,33	0,22	0,21	0,14	NZ	0,13
L	<i>T. serpyllum</i> aureus arboretum	5,46	NZ	8,08	0,22	4,74	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	0,11	NZ	NZ	NZ
M	<i>T. praecox</i> pygmaeus	0,18	NZ	NZ	0,18	0,88	NZ	NZ	0,33	0,19	NZ	1,28	NZ	NZ	NZ
N	<i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i> alpinarium	NZ	56,67	0,13	NZ	0,71	NZ	NZ	NZ	0,21	NZ	0,35	0,12	NZ	NZ
O	<i>T. citrodorus</i> 'golden dwarf' korzeń	NZ	NZ	NZ	3,12	3,98	1,18	0,41	6,34	NZ	NZ	0,97	NZ	0,76	0,49
P	<i>T. serpyllum</i> arboretum	NZ	NZ	NZ	2,96	3,77	1,18	NZ	5,04	NZ	NZ	1,52	NZ	0,58	0,59
R	<i>T. kosteleckyanus</i> śródziemnomorski	NZ	NZ	NZ	4,72	NZ	NZ	0,88	8,96	1,44	0,72	NZ	1,57	NZ	NZ
S	<i>T. marshallianus</i> alpinarium	6,30	NZ	5,12	0,13	1,12	0,14	NZ	0,47	3,90	0,41	NZ	NZ	NZ	NZ
T	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i> alpinarium	8,46	NZ	6,57	NZ	0,90	NZ	NZ	NZ	1,31	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
U	<i>T. vulgaris</i> komercyjny <sup>b</sup>	1,36	NZ	41,80	0,13	4,99	NZ	NZ	NZ	0,33	NZ	0,25	NZ	NZ	0,23

<sup>a</sup> NZ - nie znaleziono,

<sup>b</sup> Komercyjny - dostępny w handlu.

### Analiza chemometryczna

W kolejnym etapie badań wykonano analizę chemometryczną dla wyników otrzymanych dla poszczególnych gatunków tymianku (tab.12.). W pierwszym etapie, przed przystąpieniem do właściwej analizy, wykonano metody wstępnego przygotowania danych. Chromatogramy reprezentujące chemiczne odciski palców zwykle wymagają usunięcia takich komponentów jak tło i szum oraz wyrównania pików przed analizą czynników głównych - PCA. W przypadku tych badań zrezygnowano z usunięcia tła i szumu, ze względu na dość gładki charakter uzyskanych sygnałów GC-MS. Niemniej jednak, zastosowano eliminację tła (za pomocą metody PALS), jednak nie osiągnięto znaczących wyników. W celu eliminacji szumu w poszczególnych sygnałach wykorzystano filtry Savitsky-Golay'a, ale również i w tym przypadku nie zaobserwowano znaczącej poprawy jakości sygnału [325, 326]. Koniecznym okazało się wyrównanie pików. W tym celu wykorzystano metodę zoptymalizowanego nakładania sygnałów, która maksymalizuje wzajemną korelację sygnałów (COW). Technika ta została opisana w rozdziale 3.2.2. Tak skorygowane sygnały chromatograficzne zostały wykorzystane jako wyjściowe dane do analizy PCA.

Analiza czynników głównych jest to technika, która umożliwia eksplorację, wizualizację i kompresję danych [327]. Dzięki temu możemy konstruować zestaw nowych zmiennych nazywanych głównymi składowymi (PCs). PCs są to prostopadłe wektory, które są liniowymi kombinacjami oryginalnych zmiennych i stanowią strukturę danych poprzez maksymalizację opisu ich wariancji. Model PCA zawiera  $k$  głównych składników, gdzie  $k$  jest wybierane arbitralnie poprzez wizualną ocenę uzyskanych wyników. Oryginalna macierz danych  $X$  ( $m \times n$ ) rozkłada się zgodnie z następującym równaniem:

$$X = TP^T + E, \quad (4)$$

gdzie:  $T$  ( $m \times k$ ) - macierz wyników,

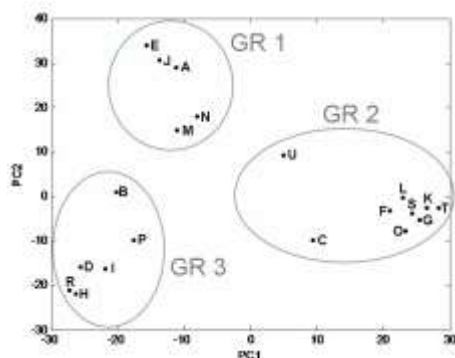
$P$  ( $n \times k$ ) - macierz wag,

$E$  ( $m \times n$ ) - macierz reszt,

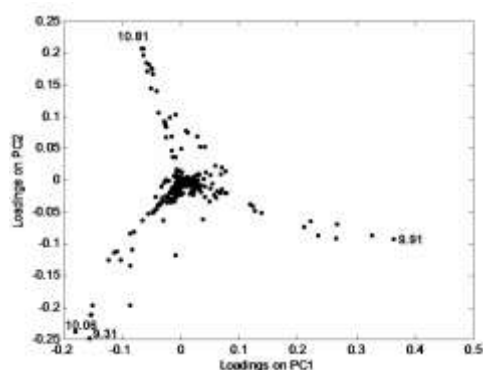
$P^T$  - macierz transponowana.

Metoda PCA umożliwia projekcję obiektów lub zmiennych na płaszczyznę, którą definiują wybrane zestawy czynników głównych [328]. Projekcja próbek na płaszczyznę określoną przez wybrane pary czynników głównych umożliwia analizę podobieństwa między próbkami. Projekcje parametrów są projekcjami zmiennych na płaszczyznach określonych przez PCs i pozwalają na wykrywanie korelacji między zmiennymi. Celem przeprowadzonej analizy było znalezienie podobieństw i różnic między chromatograficznymi odciskami palców dla lotnej frakcji 20 poszczególnych próbek tymianku.

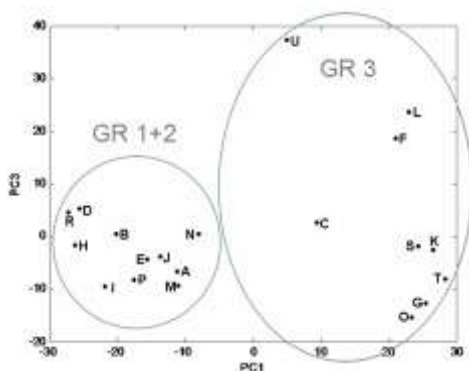
a)



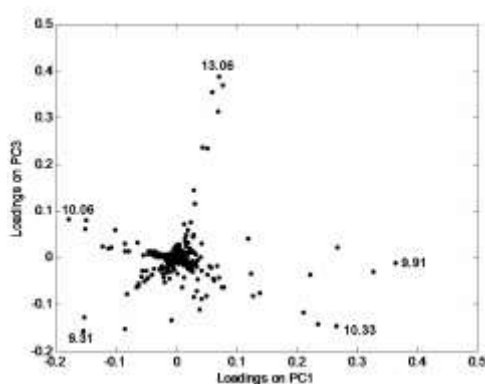
b)



c)



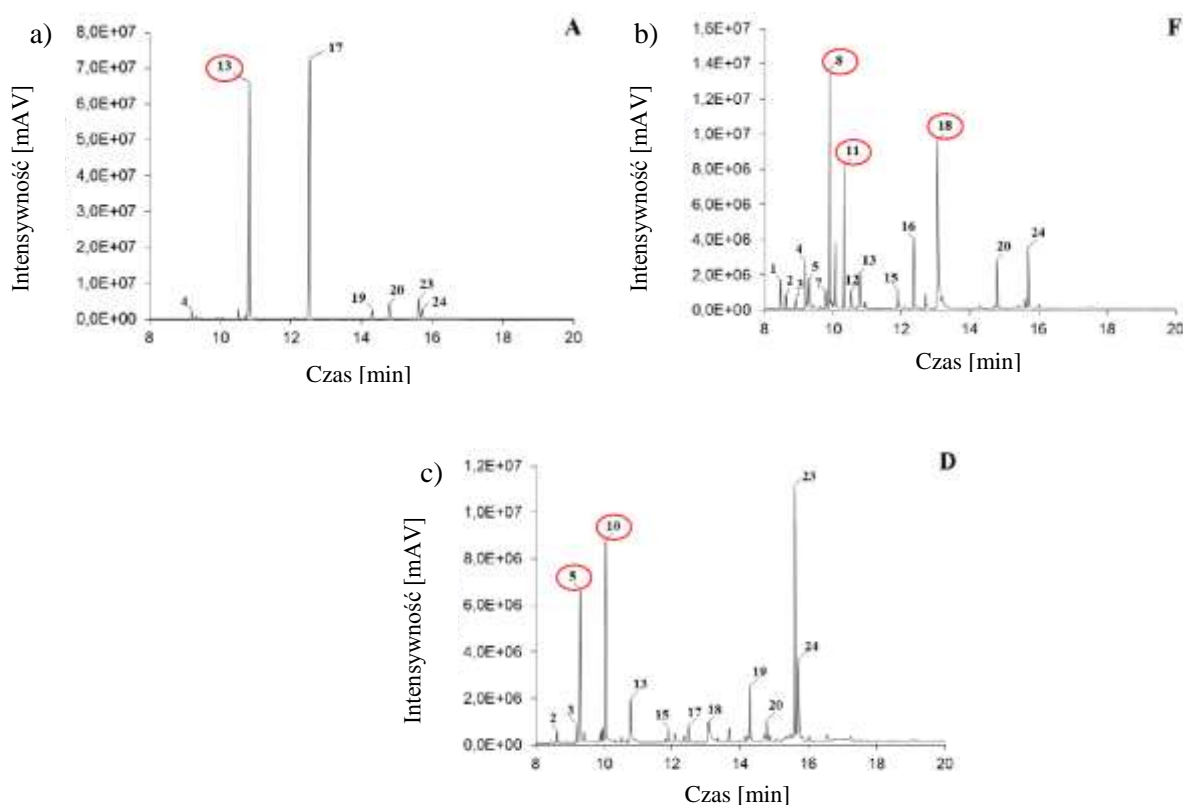
d)



Rys.27. a) projekcja obiektów PC1-PC2 dla chromatograficznych odcisków palca, b) projekcja parametrów na przestrzeń dwóch pierwszych głównych składowych, c) projekcja obiektów PC1-PC3 dla chromatograficznych odcisków palca, d) projekcja parametrów na przestrzeń pierwszej i trzeciej głównej składowej. Symbole gatunków tymianku opisane jak w tabeli 12.

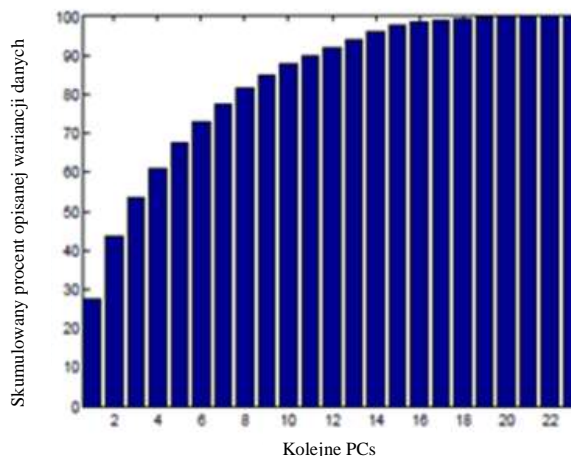


Pierwsze trzy główne składowe (PC1, PC2 i PC3) opisują około 53,4% wariancji danych. Na płaszczyźnie PC1-PC2 (rys.27a.) 20 badanych gatunków tymianku zostało sklasyfikowanych do trzech grup (grupa 1, 2 i 3). Natomiast na płaszczyźnie PC1-PC3 zaobserwowano tylko dwie niezależne grupy, ponieważ grupa 1 została połączona z grupą 2 (rys.27c.). Na projekcji parametrów (rys.27b.c.) wykropkowane „wąsy” wskazują te związki lotnej frakcji, które różnicują próbki (każda kropka odpowiada poszczególnemu czasowi retencji  $t_R$ ). Sześć różnych związków z relatywnie wysoką intensywnością uzyskanych pików (odpowiednie czasy retencji  $t_R$  są przedstawione na rysunku 27.b.d.), pozwala na sklasyfikowanie 20 gatunków tymianku na trzy grupy. Sześć opisanych związków zostało zaznaczonych owalami na wybranych chromatogramach zaprezentowanych na rysunku 28.



Rys.28. Chromatogramy otrzymane dla wybranych gatunków tymianku a) gatunek A należący do grupy 1, b) gatunek F należący do grupy 2, c) gatunek D należący do grupy 3. Symbole gatunków tymianku opisane jak w tabeli 12.

Wszystkie gatunki tymianku należące do grupy 1 różnią się od tych należących do grupy 2 i 3 intensywnym pikiem przy czasie retencji  $t_R = 10,80$  min odpowiadającym związkowi  $\beta$ -linalol (który jest nieobecny w dwóch wcześniej wspomnianych grupach) - rysunek 28a. Wszystkie gatunki tymianku zaliczone do grupy 2 charakteryzują trzy intensywne piki przy czasach retencji  $t_R$ : 9,92, 10,33 i 13,11 min odpowiadające odpowiednio: mieszaninie izomerów m-cymen i/lub o-cymen,  $\tau$ -terpinenowi i mieszaninie izomerów karwakrol i/lub tymol (które są nieobecne w grupie 1 i 3) - rysunek 28b. Natomiast w ostatniej, 3 grupie, wszystkie gatunki tymianku charakteryzują dwa intensywne piki przy czasach retencji  $t_R$ : 9,31 i 10,06 min (rys.28c.). Piki te zidentyfikowano odpowiednio jako  $\beta$ -pinen i eukaliptol, które są nieobecne w dwóch pierwszych grupach. Skumulowany procent opisanej wariancji danych przy kolejnych głównych składowych jest przedstawiony na rysunku 29.



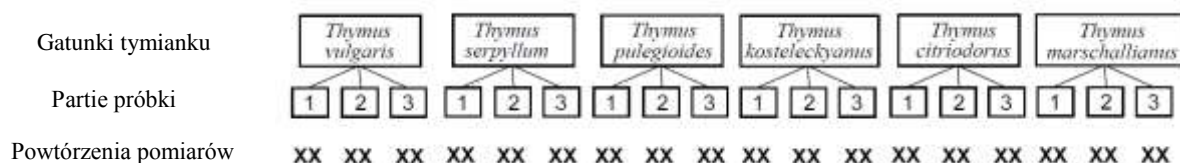
Rys.29. Skumulowany procent opisanej wariancji danych przy kolejnych PCs.

## 6. Chemometryczne porównanie zawartości związków fenolowych dla sześciu wybranych gatunków tymianku

W kolejnym etapie badań porównano całkowitą zawartość związków fenolowych w sześciu wybranych gatunkach tymianku z zastosowaniem metod chemometrycznych. Analizie poddano następujące rośliny: *T. vulgaris*, *T. serpyllum*, *T. pulegioides*, *T. kosteleckyanus*, *T. citriodorus* ‘golden dwarf’ oraz *T. marschallianus*.

Porównanie wybranych gatunków tymianku może być wykonane zarówno dla całkowitej zawartości związków fenolowych lub bazując na średnich densytogramach jako ich odciskach palca. Z chromatograficznego punktu widzenia ostatnia z wyżej wymienionych strategii jest bardziej interesująca, ponieważ pozwala na identyfikację obszaru (lub obszarów) w średnim densytogramie, co może być związane z różną zawartością związków fenolowych w analizowanych gatunkach tymianku. Z tego powodu takie metody jak: ANOVA - połączona z analizą czynników głównych (ANOVA-PCA) [329] oraz ANOVA - z jednoczesną analizą czynników (ANOVA-SCA) [330-333] charakteryzują się dużą popularnością w ostatnich latach.

Metoda ANOVA-SCA polega na wyborze modelu zgodnie z planowanym eksperymentem, oceniając działanie czynników i ich istotność oraz równocześnie stosując takie techniki redukcji wymiarowości jak SCA lub PCA do interpretacji i wizualizacji czynnika efektu danych. Dwustopniowy projekt zawierający porównanie sześciu gatunków tymianku przedstawia rysunek 30. Trzy partie ekstraktów otrzymane w wyniku ekstrakcji ASE uzyskane dla każdego z badanych gatunków analizowano w dwóch powtórzeniach. Partie próbki zostały odpowiednio nazwane w celu przypisania ich do gatunku.



Rys.30. Schemat projektu doświadczenia z dwoma czynnikami tj. gatunku tymianku i partii próbki, które są przydzielone odpowiednio do gatunku tymianku. Każdy 'x' oznacza średni densytogram po wstępnym przygotowaniu danych.

Wstępnie przygotowane średnie densytogramy dla wszystkich gatunków są uporządkowane w macierz  $X$  o wymiarowości  $(I \times J)$ . Następnie przydzielony model ANOVA dla  $j$ -tych ( $j = 1, 2, \dots, J$ ) punktów pomiarowych dla  $i$ -tych ( $i = 1, 2, \dots, I$ ) próbek na  $kl$  poziomach (gdzie  $k = 1, 2, \dots, K$  i  $l = 1, 2, \dots, L$ ) dla pierwszego czynnika (gatunku) z efektem  $\alpha_k$  i drugiego czynnika (partie próbki) z efektem  $\beta_l$ ,  $x_{iklj}$  dla macierzy  $X$  może być opisany w następujący sposób:

$$x_{iklj} = \mu_j + \alpha_{kj} + \beta_{l(k)j} + \varepsilon_{iklj} \quad (5)$$

gdzie:  $\mu_j$  - jest to wartość średnia, która została wyliczona dla  $j$ -tego punktu pomiarowego,

$\varepsilon_{iklj}$  - określenie błędu.

Najbardziej interesującym w tym badaniu jest prosty, jednoczynnikowy efekt, który wyjaśnia różnice między gatunkami.

Wkłady do wariancji wszystkich  $I$  próbek opisanych przez  $J$  punktów pomiarowych mogą być zebrane w odpowiednią macierz efektu o wymiarach  $I \times J$ , co możemy przedstawić jako:

$$X = M + X_\alpha + X_\beta + X_\varepsilon \quad (6)$$

W rzeczywistości rozkład, który opisuje równanie 5, stosuje się do każdego punktu pomiarowego, natomiast każda macierz efektu, opisana równaniem 6, zawiera tak wiele identycznych wektorów wierszowych, jak wiele jest poziomów w odpowiednim czynniku. Średnia macierz  $X$ , ma jeden stopień i wszystkie wiersze są identyczne oraz równe ogólnej średniej kolumn macierzy  $X$ . Po centrowaniu  $(X-M)$ , elementy wierszy  $X_\alpha$  są obliczane jako średnie kolumn wyliczanych z  $K$  grup. Podobnie elementy przypisanego efektu  $X_\beta$ , są oszacowane po obniżeniu wartości. Przestrzenie kolumn macierzy efektu są prostopadłe do siebie, a zatem podział całkowitej sumy kwadratów,  $SS_{total}$ , możemy przedstawić w następujący sposób:

$$SS_{total} = SS_M + SS_\alpha + SS_\beta + SS_\varepsilon \quad (7)$$

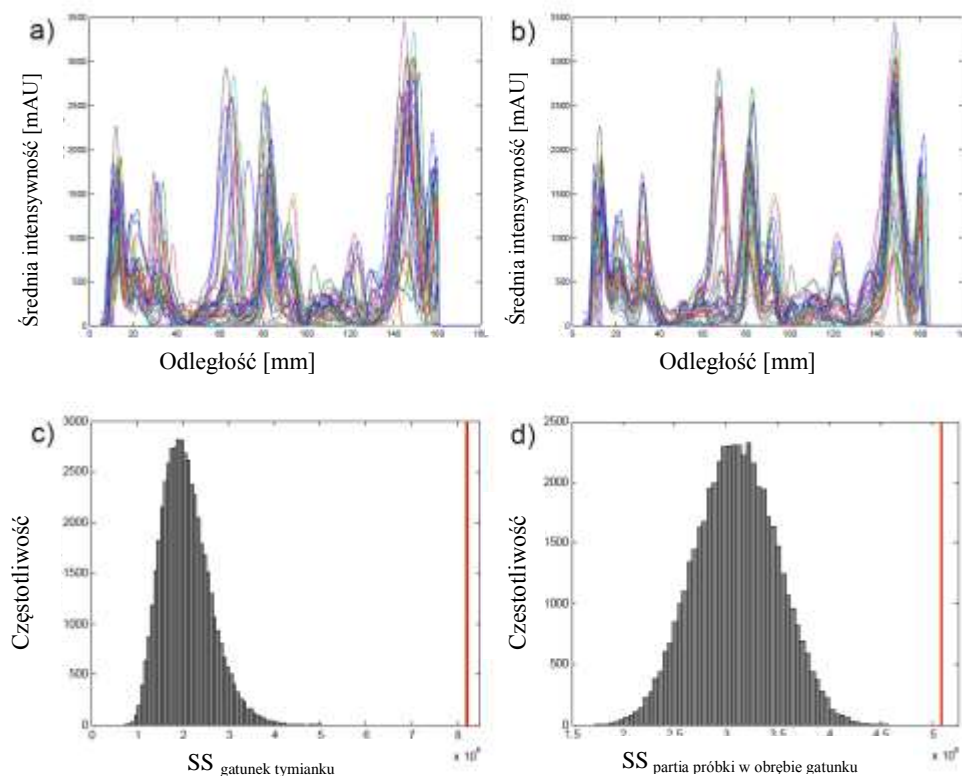
Testowanie istotności indywidualnych efektów jest wykonane za pomocą permutacji reszt na podstawie zredukowanego modelu jako najlepsza strategia przy założeniu, że błędy są zazwyczaj nie rozproszone [334]. Gdy suma kwadratów dla danych eksperymentalnych jest niższa od sumy kwadratów dla danych po permutacji, dla większości przypadków, hipoteza zerowa dla badanego efektu jest następnie akceptowana, ponieważ nie ma istotnych różnic między średnią grupą. Poziom istotności (wartość  $P$ ) oblicza się jako liczbę permutacji, w których suma kwadratów jest większa niż rzeczywiste wartości eksperymentalne sum kwadratów.

Ostatnim krokiem metody ANOVA-SCA jest wizualizacja i interpretacja zależności wśród mierzonych punktów za pomocą techniki redukcji wymiarowości, takiej jak SCA dla każdej macierzy efektu. Podmodel SCA dla pierwszej macierzy efektu, która wyjaśnia różnice między sześcioma gatunkami, możemy określić w następujący sposób:

$$X_\alpha = T_\alpha P_\alpha^T + E_\alpha \quad (8)$$

Dzięki SCA, pierwsza macierz efektu, jest rozłożona na dwie macierze: macierz wyników  $T_a$  o wymiarach  $I \times f$ , która jest związana z projekcją próbek na przestrzeń objętą przez  $f$  składowych oraz macierz wag  $P_a$ , która jest związana z projekcją parametrów na przestrzeń opisaną przez  $f$  składowych. Nowe  $f$  komponenty są liniową kombinacją oryginalnych zmiennych i są otrzymane przez maksymalizację wariancji dla przewidywanych danych. Macierz  $E_a$  zawiera część wariancji, która nie jest wyjaśniona przez podmodel. Stopień macierzy  $X_a$  jest równy liczbie poziomów minus jeden ( $K-1$ ) i w związku z tym sugeruje wiele ukrytych składników tego podmodelu.

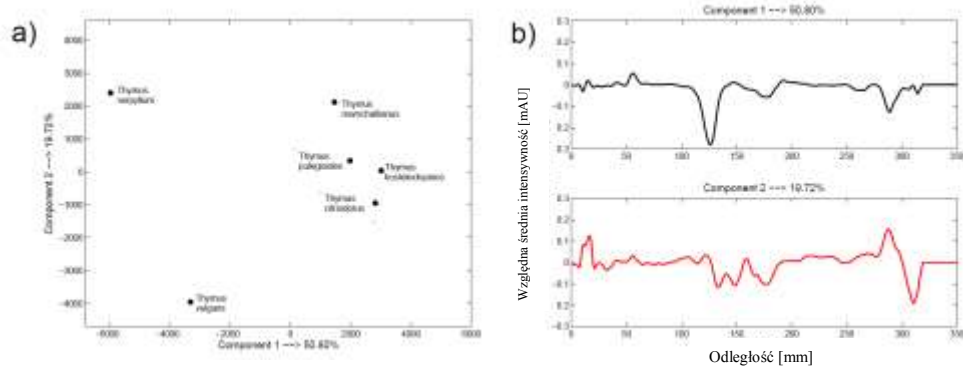
Porównanie sześciu gatunków tymianku zostało wykonane przy pomocy średnich densytogramów (chromatograficznych odcisków palców). W tym celu została wykonana eliminacja tła, a następnie korekcja linii podstawowej z zastosowaniem metody PALS dla średnich densytogramów, które otrzymano w zoptymalizowanych wcześniej warunkach dla ekstrakcji ASE. Parametr kary został wybrany jako 10000. Łącznie 36 średnich densytogramów (przedstawionych na rysunku 31a) otrzymano zgodnie z planem eksperymentu opisanego równaniem 5 i przedstawionego schematycznie na rysunku 30.



Rys.31. Porównanie sześciu gatunków tymianku: a) wszystkie 36 oryginalne średnie densytogramy, b) wszystkie densytogramy po korekcji linii podstawowej i nałożeniu. Histogramy zbudowane z 50 000 permutacji dla c) efektu 'gatunek tymianku', d) efektu 'partii próbki w obrębie gatunku tymianku'.

Po korekcji linii podstawowej, piki densytogramów, które są przedstawione na rysunku 31a, są przesunięte wzdłuż osi odległości, dlatego musimy zastosować korekcję pików przed dalszą analizą. Nakładanie sygnałów przeprowadzono za pomocą algorytmu COW (opisanego w rozdziale 3.2.2). Target stanowił średni densytogram posiadający największą średnią wartość współczynnika korelacji. Następnie pozostałe sygnały zostały nałożone z zastosowaniem metody COW przy użyciu parametru elastyczności równego dwa, a każda sekcja zawierała dziesięć punktów pomiarowych. Końcowe nałożone średnie densytogramy przedstawiono na rysunku 31b.

Dwustopniowy dopasowany projekt ANOVA został użyty do testowania wpływu różnego rodzaju gatunków tymianku ( $K = 6$ ) oraz różnych jego partii. Istotność tych efektów określono z wykorzystaniem permutacji. Głównym założeniem permutacji jest porównanie rzeczywistej sumy kwadratów dla efektu z podzieloną sumą kwadratów, które są otrzymywane z permutowanych danych. Hipoteza zerowa definiowana jako ta, dla której badany czynnik nie ma efektu, jest akceptowana kiedy suma kwadratów dla rzeczywistych danych jest mniejsza niż suma kwadratów dla permutacyjnych danych. Dlatego też, nie ma istotnych różnic pomiędzy oryginalnymi średnimi grup, które są zdefiniowane w celu zbadania efektu, a średnie są obliczane po randomizacji próbek tych grup. Wartość  $P$  jest obliczana jako iloraz liczby przypadków, w których suma kwadratów dla danych permutacyjnych jest większa niż suma kwadratów dla oryginalnych danych do całkowitej liczby permutacji. Dwa histogramy, które zostały skonstruowane dla 50000 permutacji dla badanych efektów przedstawia rysunek 31 c i d. Obie hipotezy zerowe są zdefiniowane jako te, w których nie występują istotne różnice między gatunkami tymianku oraz między partiami próbek w obrębie gatunku. Rzeczywiste sumy kwadratów dla obu histogramów są większe niż sumy kwadratów dla danych po permutacji, co wskazują, że hipotezy zerowe należy odrzucić. Inaczej mówiąc, oba efekty są istotne przy wartości  $P$  równej  $1/50000$ . Oznacza to, że zawartość związków fenolowych różni się pomiędzy sobą dla różnych gatunków tymianku. Ponadto, interesujące jest zbadanie różnic/podobieństw pomiędzy poszczególnymi gatunkami, co opisuje równanie 8, za pomocą SCA macierzy efektu  $X_a$ . Ponieważ zarówno analiza jakościowa, jak i ilościowa nie została przeprowadzona z powodu słabego rozdziału chromatograficznego w densytogramach, interpretacja za pomocą określonego składu związków fenolowych nie jest możliwa. Oznaczenie poszczególnego składu związków fenolowych, które znajdują się w określonym miejscu na płytce (tzw. plamki) wymaga dodatkowej analizy jakościowej.



Rys.32. Jednoczesna analiza czynników - podmodel efektu 'gatunek tymianku: a) projekcja gatunków na powierzchnię opisaną przez pierwszy i drugi składnik, oraz b) projekcja średniej intensywności punktów pomiarowych dla pierwszego i drugiego składnika.

Projekcja gatunków w przestrzeni, która została opisana przez pierwsze dwa czynniki i odpowiednie względne wkłady parametrów jest przedstawiona na rysunku 32 a i b. Dwa składniki SCA tego podmodelu opisują 70,52% całkowitej wariancji modelu. Po pierwsze zaobserwowano, że zawartość związków fenolowych w czterech gatunkach, tj. *T. pulegioides*, *T. kosterlekyanus*, *T. citriodorus* oraz *T. marschallianus*, różni się od pozostałych dwóch: *T. vulgaris* i *T. serpyllum*. Konkretnie, różnice te są związane z różnicami w stężeniu związków fenolowych, które znajdują się w odległości 60-70 mm od punktu początkowego densytogramu. Po drugie stwierdzono, iż różnice występują przede wszystkim między gatunkiem *T. vulgaris*, a pozostałymi badanymi roślinami.

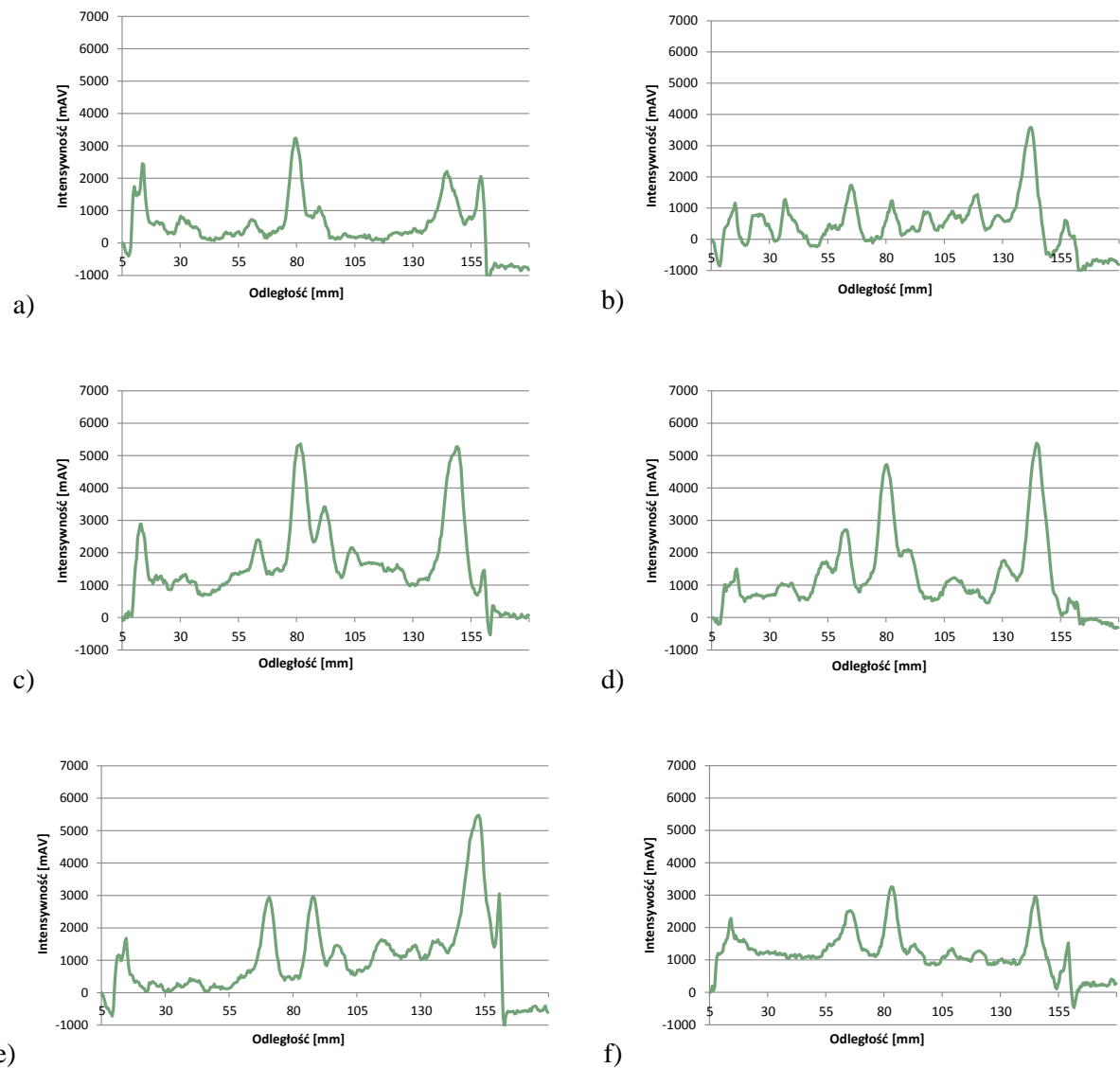
## **7. Porównanie składu chemicznego ekstraktów dla wybranych gatunków tymianku**

### **7.1. Chromatografia cienkowarstwowa**

Analizę techniką TLC wykonano przy użyciu komór chromatograficznych poziomych typu „sandwich”. W celu rozdzielenia związków wykorzystano szklane płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym Si 60 F<sub>254</sub> (10 cm × 20 cm). Przed rozpoczęciem analizy płytki chromatograficzne aktywowano w temperaturze 110°C przez 15 minut. Uzyskane ekstrakty nanoszono na płytki punktowo w objętości 10 µL. Ekstrakty każdorazowo rozwijano w poziomych komorach, które uprzednio wysycano przez 15 minut porcjami fazy ruchomej. Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę octanu etylu, kwasu mrówkowego, kwasu octowego i wody w stosunku objętościowym 100:11:11:13. Chromatogramy rozwijano na odległość 15 cm, a następnie suszono w standardowych warunkach przez 2 godziny. Po wysuszeniu płytki wywoływano przy użyciu substancji wywołującej, którą był 10% metanolowy roztwór kwasu siarkowego(VI), a następnie wygrzewano je w temperaturze 110°C przez 20 minut. Tak uzyskane chromatogramy skanowano wykorzystując zjawisko fluorescencji, przy użyciu densytometru skaningowego.

Analizując densytogramy analizy chromatograficznej ekstraktów związków fenolowych można stwierdzić, że wszystkie badane gatunki tymianku różnią się między sobą zarówno ilością, jak i intensywnością uzyskanych pików chromatograficznych. W pracy przedstawiono chromatogramy dla sześciu gatunków najbardziej różniących się między sobą zawartością związków fenolowych.





Rys.33. Densytogramy analizy chromatograficznej ekstraktów otrzymane dla gatunków:  
a) *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele b) *T. pannonicus* alpinarium c) *T. pulegioides* subsp.  
pulegioides alpinarium d) *T. tiflisiensis* użytkowy e) *T. pseudolanuginosus* arboretum f) *T. praecox*  
subsp. arcticus alpinarium przy długości fali 380 nm.

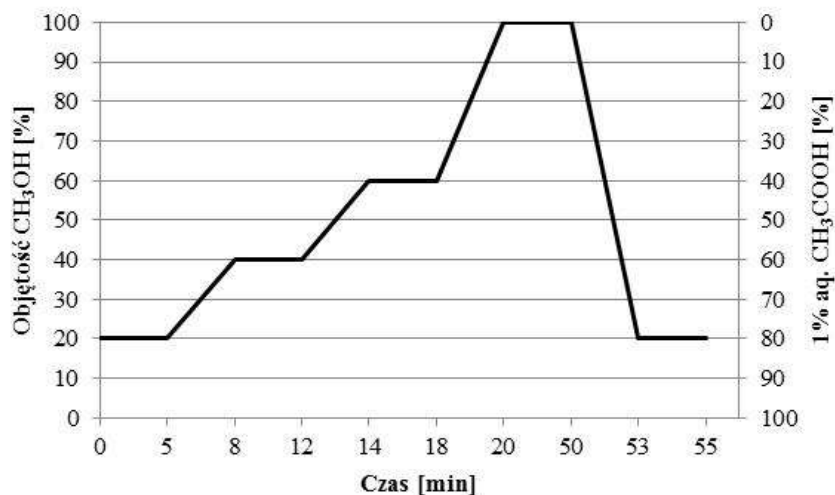
Dla gatunku *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele zaobserwowano pięć pików chromatograficznych. Wśród nich największą intensywnością charakteryzuje się pik o współczynniku retardacji  $R_F = 0,47$ . Gatunek *T. pannonicus* alpinarium charakteryzuje się szeregiem pików chromatograficznych o niskiej intensywności. Dla pików o współczynniku retardacji  $R_F = 0,87$  zaobserwowano największą intensywność. Dla gatunku *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* alpinarium zauważono dwa piki chromatograficzne charakteryzujące się zbliżoną, dużą intensywnością o współczynnikach retardacji wynoszących odpowiednio  $R_{F1} = 0,48$  oraz  $R_{F2} = 0,93$ . Dodatkowo zauważono trzy piki o mniejszej intensywności. Gatunek *T. tiflisiensis* użytkowy również charakteryzuje się dwoma pikami chromatograficznymi o zbliżonej, dużej intensywności o współczynnikach retardacji wynoszących odpowiednio  $R_{F1} = 0,48$  oraz  $R_{F2} = 0,93$ . Jednak w przeciwieństwie do gatunku *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* alpinarium zaobserwowano aż sześć dodatkowych pików o mniejszej intensywności. Dla gatunku *T. pseudolanuginosus* arboretum stwierdzono, iż najintensywniejszy pik chromatograficzny charakteryzują współczynniki retardacji  $R_F = 0,93$ . Można również zaobserwować dwa piki o średniej intensywności o współczynnikach retardacji wynoszących odpowiednio  $R_{F1} = 0,40$  oraz  $R_{F2} = 0,53$ . Dodatkowo zauważono cztery piki o mniejszej intensywności. Wszystkie piki chromatograficzne zaobserwowane dla gatunku *T. praecox* subsp. *arcticus* alpinarium charakteryzują się najmniejszą intensywnością spośród omawianych gatunków tymianku. Możemy zauważyć dwa piki o zbliżonej intensywności o współczynnikach retardacji wynoszących odpowiednio  $R_{F1} = 0,50$  oraz  $R_{F2} = 0,93$ . Dodatkowo zaobserwowano cztery piki o niskiej intensywności.

Porównując otrzymane chromatogramy wybranych sześciu gatunków tymianku stwierdzono, że uzyskane fingerprinty umożliwiły znalezienie różnic między nimi. Analiza ta wykazała, że dla gatunku *T. pannonicus* alpinarium zaobserwowano najwięcej pików chromatograficznych, natomiast dla gatunku *T. praecox* subsp. *arcticus* alpinarium najmniej.

## 7.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

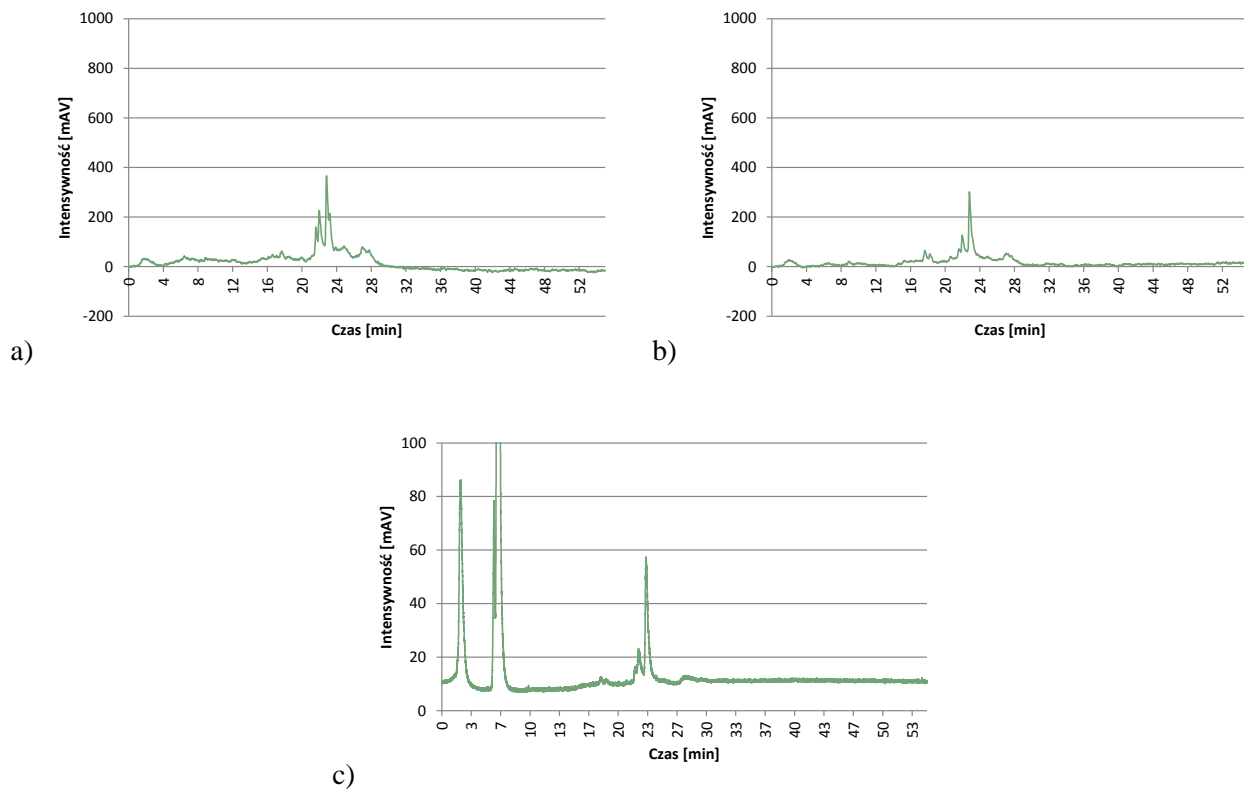
Kolejnym etapem wykonanych badań było przeprowadzenie analizy techniką HPLC dla uzyskanych odpowiednio ekstraktów wybranych gatunków tymianku. Analizę ekstraktów różnych gatunków tymianku przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego 920-LC firmy Varian wyposażonego w automatyczny dozownik, pompę gradientową, detektor DAD oraz detektor ELSD. Poniżej przedstawiono warunki prowadzonej analizy:

- ✓ faza stacjonarna: kolumna RP-18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm),
- ✓ faza ruchoma: metanol + woda z dodatkiem 1% lodowatego kwasu octowego (v/v),
- ✓ rodzaj elucji: elucja gradientowa,
- ✓ przepływ fazy ruchomej: 0,5 mL/min,
- ✓ objętość próbki: 10  $\mu\text{L}$ ,
- ✓ czas analizy: 55 minut.

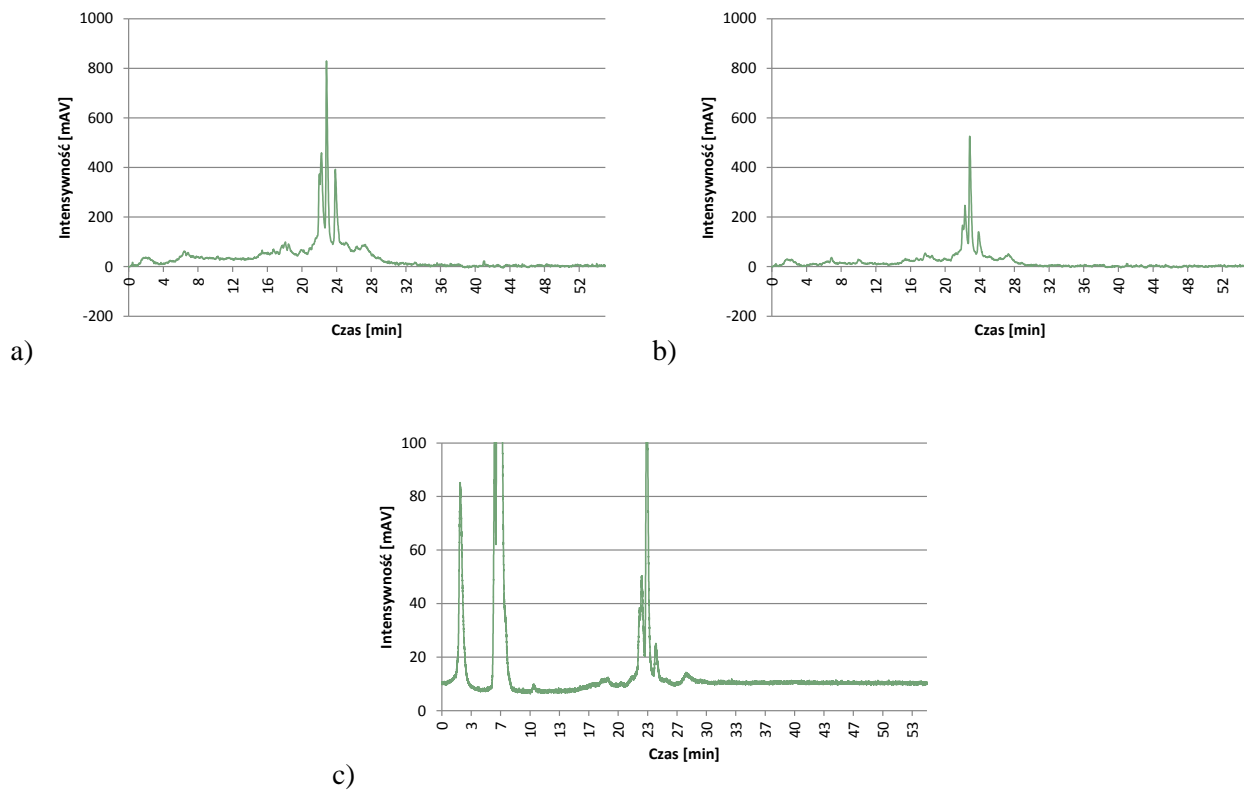


Rys.34. Profil gradientu zastosowany w analizie chromatograficznej.

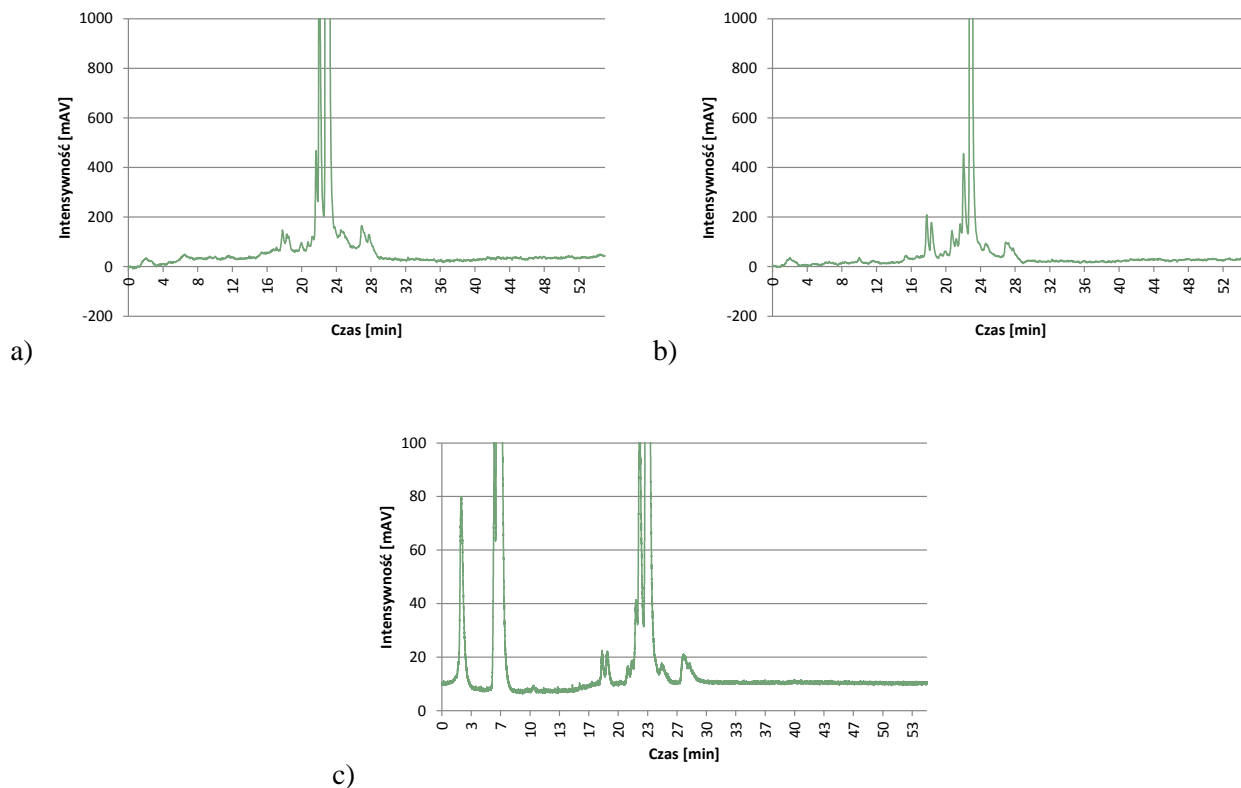
Poniżej przedstawiono przykładowe chromatogramy związków fenolowych dla trzech gatunków tymianku, uzyskane przy pomocy detektora DAD ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  oraz  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) i ELSD techniką HPLC. Wynikiem tej analizy są przedstawione poniżej chromatogramy (rys.35-37.).



Rys.35. Chromatogramy związków fenolowych otrzymane dla gatunku *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele przy pomocy: a) detektora DAD, długość fali 254 nm b) detektora DAD, długość fali 280 nm c) detektora ELSD.



Rys.36. Chromatogramy związków fenolowych otrzymane dla gatunku *T. marschallianus* alpinarium przy pomocy: a) detektora DAD, długość fali 254 nm b) detektora DAD, długość fali 280 nm c) detektora ELSD.



Rys.37. Chromatogramy związków fenolowych otrzymane dla gatunku *T. serpyllum* 'aureus' arborescens przy pomocy: a) detektora DAD, długość fali 254 nm b) detektora DAD, długość fali 280 nm c) detektora ELSD.

Porównując chromatogramy uzyskane przy użyciu detektora DAD przy dwóch długościach fali  $\lambda = 254$  nm oraz  $\lambda = 280$  nm oraz detektora ELSD stwierdzono, iż ilość rozdzielonych pików jest zbliżona dla obydwóch detektorów. Zaobserwowano również, że w niektórych przypadkach intensywność pojedynczych pików jest poza skalą. Jest to spowodowane zbyt dużym stężeniem substancji w próbce. Problem ten można rozwiązać na dwa sposoby. Pierwszym z nich jest rozcieńczenie, a drugim zmniejszenie objętości aplikowanej próbki. Wykonywana analiza była analizą porównawczą, dlatego zastosowana procedura była w każdym przypadku taka sama (ilość nastrzykiwanej próbki czy jej objętość). Dlatego skorygowanie problemu związanego z intensywnością pików było niemożliwe. W pracy przedstawiono chromatogramy dla trzech najbardziej różniących się między sobą zawartością związków fenolowych gatunków.

Analizując chromatogramy dla gatunku *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele uzyskane przy użyciu detektora DAD przy długości fali  $\lambda = 254$  nm oraz  $\lambda = 280$  nm, zaobserwowano szereg charakterystycznych pików o niskiej intensywności przy czasach retencji w zakresie od 17 do 28 min. Intensywność pików uzyskana przy obu długościach fali jest zbliżona. Analizując chromatogram uzyskany przy użyciu detektora ELSD zauważono pięć dobrze rozdzielonych pików. Pik zarejestrowany przy czasie retencji  $t_R \approx 7$  min charakteryzuje się największą intensywnością.

Porównując chromatogramy dla gatunku *T. marschallianus* alpinarium przy zastosowaniu detektora DAD zarówno przy długości fali  $\lambda = 254$  nm, jak i  $\lambda = 280$  nm zaobserwowano szereg charakterystycznych pików chromatograficznych przy czasach retencji w zakresie od 21 do 25 min. Intensywność uzyskanych pików jest większa dla chromatogramów uzyskanych przy długości fali  $\lambda = 254$  nm. Również dla detektora ELSD uzyskano szereg pików chromatograficznych w tym zakresie czasu retencji. Dodatkowo zauważono trzy piki przy czasach retencji  $t_R \approx 2$  min,  $t_R \approx 6$  min oraz  $t_R \approx 7$  min. Pik zarejestrowany przy czasie retencji  $t_R \approx 7$  min charakteryzuje się największą intensywnością.

Analizując chromatogramy dla gatunku *T. serpyllum* 'aureus' arboretum przy zastosowaniu detektora DAD zarówno przy długości fali  $\lambda = 254$  nm, jak i  $\lambda = 280$  nm zaobserwowano aż dziewięć pików chromatograficznych przy czasach retencji w zakresie od 15 do 28 min. Intensywność uzyskanych pików jest większa dla chromatogramów uzyskanych przy długości fali  $\lambda = 280$  nm. Analizując chromatogramy uzyskane dla detektora ELSD zaobserwowano dwanaście pików chromatograficznych.

Analiza porównawcza fingerprintów trzech wybranych gatunków tymianku przy pomocy techniki HPLC umożliwiła znalezienie różnic między nimi. Analiza ta wykazała, iż najbogatszym w związki gatunkiem jest gatunek *T. serpyllum* 'aureus' arboretum. Dodatkowo detektor ELSD pozwolił na zarejestrowanie trzech pików (przy czasach retencji  $t_R \approx 2$  min,  $t_R \approx 6$  min oraz  $t_R \approx 7$  min), których nie zaobserwowano przy zastosowaniu detektora DAD przy dwóch długościach fali,  $\lambda = 254$  nm oraz  $\lambda = 280$  nm.

## 8. Analiza właściwości przeciwbakteryjnych dla wybranych gatunków tymianku

W pierwszym etapie analizy odpowiednio przygotowano uzyskane w optymalnym warunkach ekstrakcji ASE próbki wybranych gatunków tymianku. W tym celu ekstrakty przesączono przez Anotop<sup>TM</sup> 25 Plus (0,02  $\mu$ m). Następnie próbki наносono punktowo za pomocą szklanej kapilary w objętości 10  $\mu$ L. W doświadczeniu wykorzystano szklane płytki chromatograficzne pokryte żel krzemionkowym Si 60 F<sub>254</sub> (10 cm x 20 cm). W przedstawionych badaniach celowo uniknięto przeprowadzenia analizy TLC i zastosowano test dot blot. Zdecydowano tak, ponieważ:

- ✓ żel krzemionkowy jest aktywnym adsorbentem chromatograficznym, który posiada słabe kationowe właściwości, co w trakcie długotrwałej procedury chromatograficznej może negatywnie wpływać na składniki ekstraktu roślinnego, obniżając jego właściwości przeciwbakteryjne,
- ✓ roślinne produkty lecznicze są dobrze znane ze względu na ich synergistyczne działanie, co oznacza, że izolowanie składników lub ich części może spowodować, iż będą wykazywać słabsze właściwości przeciwbakteryjne niż naturalna ich kombinacja.

W kolejnym etapie została przygotowana zawiesina bakteryjna. Proces ten możemy podzielić na dwa etapy:

1. preinkubacja - do przeprowadzonych badań użyto kolonii bakteryjnej pobranej z kultury *Bacillus subtilis*. Bakteria ta wytwarza endospory, dlatego konieczna była wstępna inkubacja bakterii przez 20 godzin w temperaturze 37°C w celu otrzymania odpowiedniego ich miana. Następnie przez 1 godzinę w tej temperaturze przeprowadzono kolejną preinkubację w celu aktywacji.
2. inkubacja - uzyskaną z preinkubacji zawiesinę bakteryjną rozcieńczono bulionem Mueller - Hinton (pH = 7,2  $\pm$  0,2) w stosunku 1 : 20 i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie odpowiednią objętość tak rozcieńczonej zawiesiny (5 mL) dodano do 100 mL bulionu Mueller'a - Hinton'a i umieszczono na mieszadle magnetycznym w temperaturze 37°C na 6 godzin. Bulion został dodatkowo zagęszczony agarozą (0,05%).

Następnie płytki TLC zanurzano przez 8 sekund w zawiesinie bakteryjnej za pomocą TLC Immersion Device i inkubowano w temperaturze 37°C przez 17 godzin w komorze w wilgotnej atmosferze. Po etapie inkubacji płytki TLC spryskano 0,2% wodnym roztworem barwnika tetrazoliowego MTT i inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej zaobserwowano kremowo-białe strefy zahamowania wzrostu bakterii na fioletowym tle, które następnie sfotografowano za



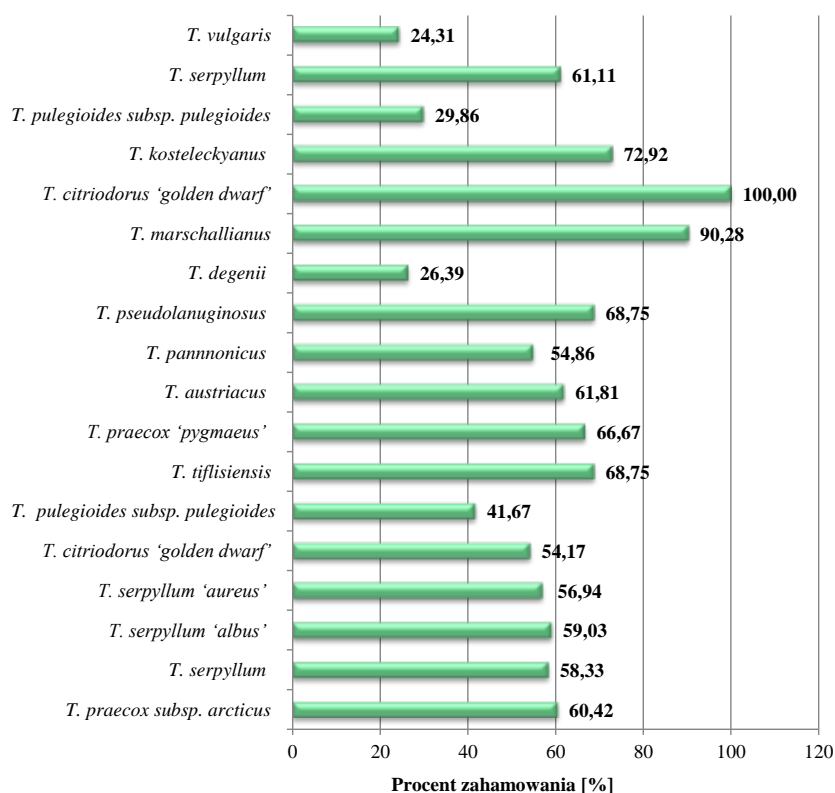
pomocą kamery cyfrowej Repostar oraz zmierzono za pomocą planimetru biegunowego uzyskując strefy zahamowania wzrostu bakterii w  $\text{cm}^2$ .

W wyniku przeprowadzenia testu dot blot w połączeniu z bioautografią bezpośrednią stwierdzono, iż wszystkie osiemnaście przebadanych ekstraktów tymianku otrzymanych w wyniku ekstrakcji ASE w optymalnych warunkach ( $130^\circ\text{C}$ ; metanol-woda, 27:73, v/v) wykazuje właściwości przeciwbakteryjne. Dokładne wartości stref zahamowania wzrostu bakterii przedstawia tabela 13.

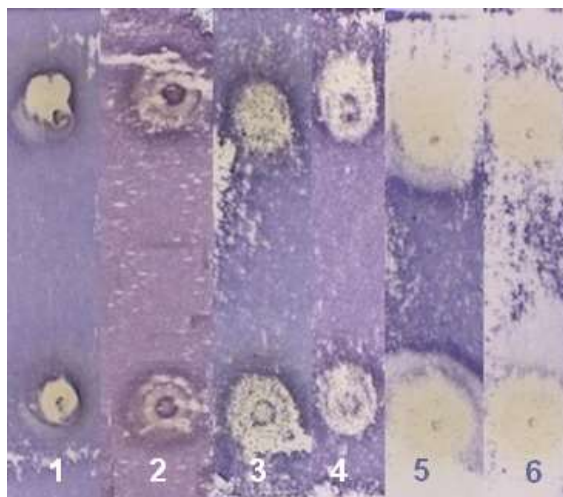
Tab.13. Nazwy wszystkich przebadanych gatunków wraz z ich miejscem hodowli w Ogrodzie Botanicznym oraz z odpowiednimi wartościami stref zahamowania wzrostu bakterii.

Lp.	Nazwa gatunku	Miejsce hodowli w Ogrodzie Botanicznym	Strefa zahamowania [ $\text{cm}^2$ ] $\pm$ SD
1	<i>T. vulgaris</i>	użytkowy	0,35 ( $\pm$ 0,03)
2	<i>T. serpyllum</i>	arboretum	0,88 ( $\pm$ 0,11)
3	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	alpinarium	0,43 ( $\pm$ 0,02)
4	<i>T. kosteleckyanus</i>	śródziemnomorski	1,05 ( $\pm$ 0,11)
5	<i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' ziele	systematyka	1,44 ( $\pm$ 0,07)
6	<i>T. marschallianus</i>	alpinarium	1,30 ( $\pm$ 0,07)
7	<i>T. degenii</i>	śródziemnomorski	0,38 ( $\pm$ 0,06)
8	<i>T. pseudolanuginosus</i>	arboretum	0,99 ( $\pm$ 0,04)
9	<i>T. pannonicus</i>	alpinarium	0,79 ( $\pm$ 0,03)
10	<i>T. austriacus</i>	arboretum	0,89 ( $\pm$ 0,01)
11	<i>T. praecox</i> 'pygmaeus'	alpinarium	0,96 ( $\pm$ 0,02)
12	<i>T. tiflisiensis</i>	użytkowy	0,99 ( $\pm$ 0,06)
13	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	użytkowy	0,60 ( $\pm$ 0,02)
14	<i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' korzeń	systematyka	0,78 ( $\pm$ 0,06)
15	<i>T. serpyllum</i> 'aureus'	arboretum	0,82 ( $\pm$ 0,01)
16	<i>T. serpyllum</i> 'albus'	użytkowy	0,85 ( $\pm$ 0,03)
17	<i>T. serpyllum</i>	systematyka	0,84 ( $\pm$ 0,02)
18	<i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i>	alpinarium	0,87 ( $\pm$ 0,05)

Analizując dane przedstawione w tabeli 13 zaobserwowano, że średnie powierzchnie stref zahamowania wzrostu bakterii (dla trzech powtórzeń) mieszczą się w zakresie od 0,35 do 1,44 cm<sup>2</sup>. Gatunki, które wykazały największe właściwości przeciwbakteryjne to *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele - 1,44 cm<sup>2</sup> (próbka nr 5) oraz *T. marschallianus* - 1,3 cm<sup>2</sup> (próbka nr 6), natomiast najmniejsze wartości wykazały gatunki *T. vulgaris* - 0,35 cm<sup>2</sup> (próbka nr 1) oraz *T. degenii* - 0,38 cm<sup>2</sup> (próbka nr 7). Na rysunku 38 przedstawiono graficzne porównanie właściwości przeciwbakteryjnych dla wszystkich przebadanych gatunków tymianku. Jako jednostkę zastosowano procenty, przy czym wszystkie wartości zostały przeliczone względem gatunku o największych właściwościach (*T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele), dla którego wartość wynosiła 100%. Natomiast na rysunku 39 zamieszczono zdjęcia przedstawiające wyniki analizy bioautografii bezpośredniej dla gatunków o największych, średnich i najmniejszych właściwościach przeciwbakteryjnych.



Rys.38. Graficzne porównanie właściwości przeciwbakteryjnych dla wszystkich przebadanych gatunków tymianku, przeliczone względem gatunku *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele, dla którego wartość wynosiła 100%.



Rys.39. Zdjęcie płytki chromatograficznej przedstawiające wyniki testu dot blot połączonego z bioautografią bezpośrednią dla gatunków o najniższych (*T. vulgaris* - 1 i *T. degenii* - 2), średnich (*T. serpyllum* 'albus' - 3 i *T. praecox* subsp. *arcticus* - 4) oraz największych właściwościach przeciwbakteryjnych (*T. marschallianus* - 5 i *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele - 6).

Badając dane literaturowe stwierdzono, iż do tej pory nie została przeprowadzona analiza właściwości przeciwbakteryjnych przy pomocy testu dot blot połączonego z bioautografią bezpośrednią dla wybranych gatunków tymianku. Ponadto nie są dostępne materiały dotyczące właściwości przeciwbakteryjnych frakcji polarnej ekstraktów otrzymanych dla gatunków *T. citriodorus* and *T. marschallianus*, dla których w badaniach uzyskaliśmy najlepsze rezultaty. W związku z tym porównanie naszych wyników z wynikami literaturowymi nie jest możliwe. Jak już wspomniano, gatunki *T. vulgaris* i *T. degenii* wykazały najslabsze właściwości przeciwbakteryjne. W literaturze możemy znaleźć informację dotyczące gatunku *T. vulgaris* (tymianek pospolity), czego można się było spodziewać, gdyż jest to najpopularniejszy przedstawiciel tego rodzaju roślin. Badania przeprowadzono zarówno dla frakcji lotnej [335], jak i nielotnej - fenolowa frakcja [336]. Natomiast dla drugiego gatunku - *T. degenii* nie odnaleziono w literaturze żadnych informacji, co może świadczyć o jego niskiej aktywności biologicznej.

## 9. Analiza właściwości antyoksydacyjnych dla wybranych gatunków tymianku

W celu określenia właściwości przeciwutleniających dla ekstraktów poszczególnych gatunków tymianku otrzymanych w wyniku ekstrakcji ASE w optymalnych warunkach (temperatura 130°C, rozpuszczalnik metanol : woda, 27:73 (v/v)), jako źródło wolnych rodników zastosowano:

- ✓ 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl, DPPH,
- ✓ 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian), ABTS.

Do analizy wykorzystano trzy metody analityczne:

- ✓ test dot blot,
- ✓ spektroskopię elektronowego rezonansu (EPR),
- ✓ spektrofotometrię UV-Vis.

W pierwszym etapie przed wykonaniem każdej analizy ekstrakt przesączono przez Anotop<sup>TM</sup> 25 Plus (0,02 µm). Następnie poddano je dalszej analizie.

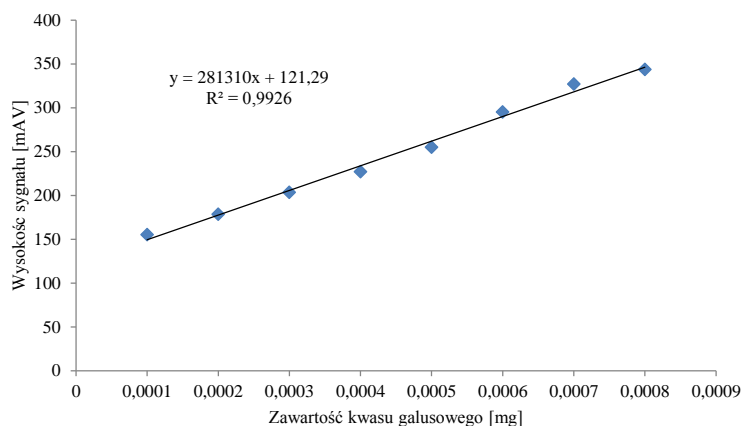
### 9.1. Test dot blot z zastosowaniem odczynnika DPPH

W teście dot blot próbkę ekstraktu nanoszono punktowo w ilości 1 µL szklaną kapilarą na płytkę chromatograficzną. W doświadczeniu wykorzystano szklane płytki chromatograficzne pokryte mikrokryształiczną celulozą, 20 cm x 20 cm. Odległość pomiędzy poszczególnymi naniesionymi ekstraktami wynosiła 2,5 cm. Po wysuszeniu płytki wywoływano, spryskując je 0,3% (w/v) metanolemowym roztworem DPPH. Spryskane płytki pozostawiono przez 30 minut w ciemnym miejscu w celu ustalenia się stanu równowagi reakcji zachodzącej między związkami wykazującymi właściwości antyoksydacyjne a DPPH. W wyniku tego procesu zaobserwowano zmianę koloru z purpurowego na żółty dla związków wykazujących właściwości przeciwutleniające. Następnie płytki skanowano przy użyciu densytometru skanującego. Pomiar wykonano mierząc absorbancję przy długości fali 545 nm. Jako substancję wzorcową wykorzystano kwas galusowy. W celu sporządzenia krzywej wzorcowej przygotowano odpowiednie wodne roztwory substancji wzorcowej, które nanoszono w porcjach od  $0,1 \times 10^{-3}$  do  $0,8 \times 10^{-3}$  mg/plamkę o interwale  $0,1 \times 10^{-3}$  mg/plamkę. Następnie płytki wywoływano spryskując je 0,3% (w/v) metanolemowym roztworem DPPH. W wyniku przeprowadzonej analizy sporządzono krzywą kalibracyjną, którą opisuje poniższe równanie:

$$y = 281310 x + 121,29 \quad (8)$$

o współczynnika korelacji  $r^2 = 0,9926$  (rys.40.). Równanie to opisuje zależność pomiędzy wysokością sygnału - y [mAV], a ilością kwasu galusowego x [mg]. Równanie to pozwoliło ocenić zdolności antyoksydacyjne poszczególnych gatunków tymianku z zawartością kwasu galusowego, jako antyoksydanta. Każdy pomiar przeprowadzono

w trzech powtórzeniach, a do dalszych porównań i dyskusji użyto średnią arytmetyczną otrzymanych wartości. Wyniki przeliczano na ekwiwalent kwasu galusowego, mg na 1 g suchej masy ziół i przedstawiono wraz z pozostałymi wynikami analiz w tabeli 14.



Rys.40. Krzywa kalibracyjna substancji wzorcowej (kwasu galusowego) wykorzystana w teście dot blot.

W wyniku przeprowadzenia analizy przy pomocy testu dot blot stwierdzono, iż wszystkie przebadane gatunki tymianku wykazują właściwości przeciwutleniające. Na rysunku 41 przedstawiono przykład płytki chromatograficznej uzyskanej po zakończeniu testu dot blot. Analizując wyniki z tabeli 14 stwierdzono, że wartości zdolności antyoksydacyjnych przeliczone na zawartość kwasu galusowego mieszczą się w przedziale od 11,94 do 60,16 mg KG/1 g suchej masy ziołowej. Największą aktywność przeciwutleniającą zaobserwowano dla gatunków *T. serpyllum* ‘albus’ oraz *T. serpyllum* ‘aureus’ (odpowiednio 60,16 i 49,64 mg KG/1 g suchej masy ziołowej), natomiast najniższą dla *T. praecox* ‘pygmaeus’ oraz *T. citriodorus* “golden dwarf” korzeń (odpowiednio 20,70 i 11,94 mg KG/1 g suchej masy ziołowej).

W literaturze można znaleźć materiały dotyczące analizy jakościowej, jednak nie znaleziono materiałów dotyczących analizy ilościowej zdolności antyoksydacyjnych dla wybranych gatunków tymianku przy użyciu testu dot blot w połączeniu z odczynnikiem DPPH. Porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi było więc niemożliwe [337].



Rys.41. Płytk chromatograficzna przedstawiająca wyniki analizy przy pomocy testu dot blot z zastosowaniem DPPH jako źródła wolnych rodników.

## **9.2. Spektroskopia elektronowego rezonansu (EPR) z zastosowaniem odczynnika DPPH**

Badania EPR prowadzono według opisanej poniżej procedury. Pomiary spektroskopowe przeprowadzono przy użyciu spektrometru Bruker EMX EPR pracującego na wstędze mikrofalowej X (9,7 GHz). Widma EPR zostały zarejestrowane dla każdej próbki w typowych warunkach prowadzenia analizy:

- ✓ centralne pole - 3480 G,
- ✓ modulacja amplitudy - 2,0 G,
- ✓ stała czasowa - 40,96,
- ✓ moc pola mikrofalowego - 20,12 mW.

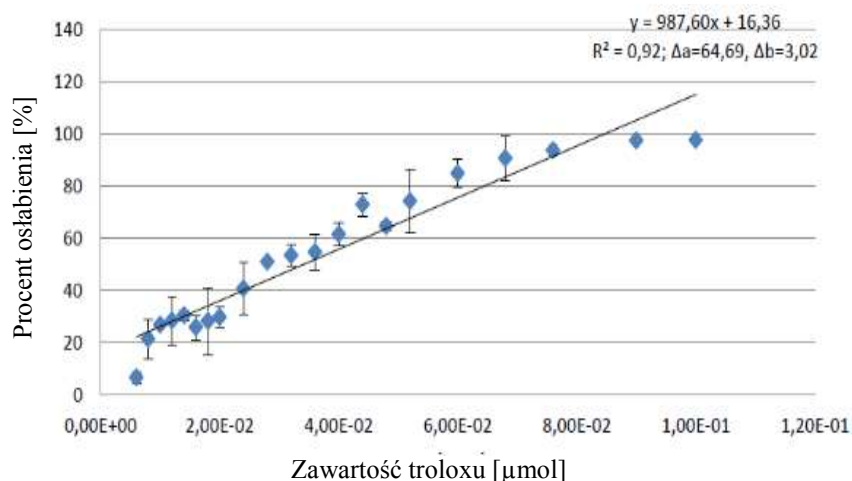
Próbkę przenoszono do kapilary o średnicy wewnętrznej 0,8 mm na głębokość 35 mm. Następnie kapilarę umieszczono w tubie EPR o średnicy 5 mm znajdującej się w podwójnym wzmacniaczu na tej samej głębokości. Użyta została zmienna jednostka temperatury (BVT 3000) w celu utrzymania stałej temperatury  $297 \pm 0,5$  K podczas pomiarów. Jako substancję wzorcową wykorzystano pochodną witaminy E, trolox.

Równanie regresji liniowej zależności między procentem inhibicji intensywności sygnału EPR a liczbą moli troloksu wynosiło:

$$y = 987,60 x + 16,36 \quad (r^2 = 0,98) \quad (9)$$

gdzie: y - procent inhibicji [%],

x - objętość próbki [mL].



Rys.42. Krzywa wzorcową: zależność procentu osłabienia intensywności sygnału EPR rodnika DPPH od ilości troloksu [338].

Równanie to zostało wykorzystane do obliczenia aktywności przeciwutleniającej badanych próbek i przedstawionych jako  $\mu\text{mol}$  troloksu/100 mL poszczególnych wyciągów tymianku.

Intensywność widma EPR zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia troloksu, co powoduje zwiększenie procentu inhibicji (I,%). Procent inhibicji widma EPR obliczono za pomocą następującego równania:

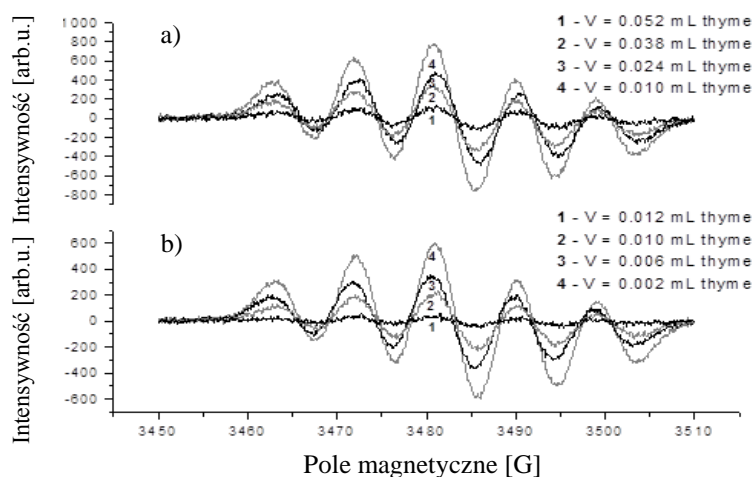
$$I, \% = [(I_0 - I)/I_0] \times 100 \quad (10)$$

gdzie:  $I_0$  - zintegrowana powierzchnia pod widmem EPR z DPPH (próba kontrolna),

I - zintegrowana powierzchnia pod widmem EPR z DPPH oraz ekstraktu tymianku.

Stosowana mieszanina reakcyjna zawierała 1 mL 200  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  etanolowego roztworu DPPH z 0,001 do 0,052 mL ekstraktu tymianku, w zależności od wykazywanych przez poszczególne gatunki właściwości antyoksydacyjnych. Dla wszystkich badanych próbek określono równania regresji liniowej zależności pomiędzy procentem inhibicji (I, %) intensywności sygnału EPR a objętością próbki badanego ekstraktu tymianku (V). Na podstawie tego równania obliczono procent inhibicji odpowiadający 100 mL odpowiedniego ekstraktu.

Następnie z krzywej standardowej otrzymanej dla troloksu otrzymano wyniki aktywności przeciwutleniającej w  $\mu\text{mol}$  troloksu/100 mL ekstraktu z tymianku, a w końcowym etapie przeliczono jako ekwiwalent mg troloksu (TEAC)/1 g suchej masy ziół. Dane przedstawione w niniejszym opracowaniu są uśrednionymi wynikami z trzech niezależnych pomiarów.



Rys.43. Schemat przedstawiający przykładowe widma EPR dla gatunku a) o najniższych wartościach oraz b) o najwyższych wartościach TEAC.

Spadek intensywności sygnału EPR próbki DPPH po dodaniu odpowiedniego ekstraktu tymianku wykazującego właściwości przeciwutleniające jest przedstawiony na rysunku 43. Wraz ze wzrostem objętości dodanej próbki intensywność sygnału maleje. Dla każdej próbki tymianku zanotowano różne widma EPR, w zależności od ilości dodawanej próbki do roztworu DPPH.



W wyniku przeprowadzonej analizy EPR z odczynnikiem DPPH stwierdzono, że wszystkie przebadane gatunki tymianku wykazały właściwości przeciwutleniające. Wartości TEAC otrzymane w wyniku analizy mieszczą się w zakresie od 33,61 do 137,53 mg troloksu/1 g suchej masy ziół (tab.14.). Największe wartości TEAC, czyli największe zdolności antyoksydacyjne zaobserwowano dla gatunków *T. serpyllum* 'albus' i *T. serpyllum* 'aureus' (odpowiednio 137,53 i 133,38 mg troloksu/1 g suchej masy ziół), natomiast najmniejsze dla gatunku *T. citriodorus* 'golden dwarf' – 33,61 mg troloksu/1 g suchej masy ziół. Porównanie danych doświadczalnych z danymi literaturowymi nie jest możliwe, ponieważ nie znaleziono żadnych analogicznych materiałów dotyczących wykonanego eksperymentu.

### 9.3. Spektrofotometria UV-Vis z zastosowaniem odczynnika DPPH

Analizę spektrofotometryczną wykonano przy użyciu spektrofotometru UV-Vis model V-530. Dla każdego pomiaru absorbancji w zakresie światła widzialnego wykorzystano 1 cm szklane kuwety. W celu określenia zdolności antyoksydacyjnych wybranych ekstraktów tymianku oraz substancji wzorcowych (kwas askorbinowy - KA i kwas galusowy - KG) wykorzystano rozcieńczony metanолоwый roztwór DPPH uzyskując absorbancję na poziomie  $0,70 \pm 0,02$  przy długości fali  $\lambda = 515$  nm. W pierwszym etapie przygotowano 0,3% metanолоwый roztwór DPPH i przechowywano go w lodówce (w temperaturze 5°C) do czasu rozpoczęcia analizy. Godzinę przed docelowymi pomiarami roztwór podstawowy DPPH umieszczono w ciemności w temperaturze pokojowej, a następnie jego część rozcieńczono do momentu uzyskania roztworu 0,003%. W celu przebadania próbek określono odpowiednią objętość ekstraktów tymianku, dla których uzyskano procent inhibicji pomiędzy 20 a 80%, po 40 minutach prowadzenia reakcji w temperaturze pokojowej w ciemności z dodatkiem 3,9 mL DPPH. Procedura analityczna była następująca:

- ✓ do każdej szklanej probówki dodano 3,9 mL metanолоwый roztworu DPPH,
- ✓ do jednej z probówek dodano 100 mL metanolu (próbа kontrolna),
- ✓ do pozostałych probówek dodano poszczególne ekstrakty tymianku. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 4 mL,
- ✓ przygotowane próbki pozostawiono na 40 minut w temperaturze pokojowej w ciemności,
- ✓ po upływie określonego czasu zmierzono absorbancje przy długości fali  $\lambda = 515$  nm.

Wszystkie pomiary prowadzono w trzech powtórzeniach, a jako wynik końcowy podano wartość uśrednioną z trzech niezależnych pomiarów. Jako próbę pozytywną wykorzystano kwas askorbinowy oraz kwas galusowy. Obliczono procent inhibicji z rodnikiem DPPH według następującego równania:

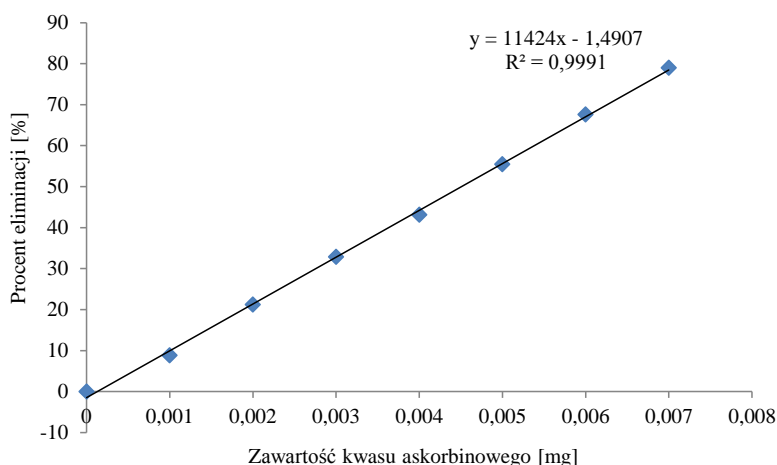
$$I, \% = [(Abs_{DPPH} - Abs_{PRÓBK})/Abs_{DPPH}] \times 100 \quad (11)$$

gdzie:  $Abs_{DPPH}$  - początkowa absorbancja rozcieńczonego roztworu DPPH,

$Abs_{PRÓBK}$  - absorbancja badanych próbek po 40 minutach trwania reakcji [339].

Wyniki uzyskane dla poszczególnych ekstraktów tymianku wyrażono jako równoważnik kwasu askorbinowego i kwasu galusowego, przy użyciu odpowiednich krzywych kalibracyjnych. W przedstawionych poniżej równaniach x równa się odpowiednio zawartości kwasu askorbinowego i kwasu galusowego w mg. Dla kwasu askorbinowego krzywa kalibracyjna ma następującą postać:

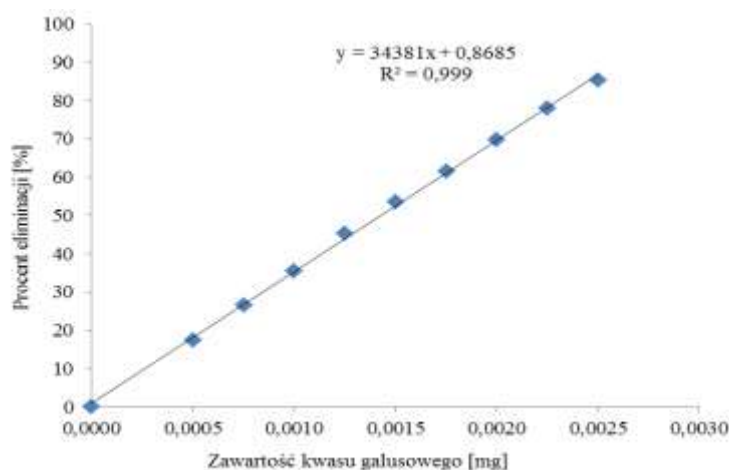
$$I, \% = 11424 x - 1,49 \quad (r^2 = 0,9991) \quad (12)$$



Rys.44. Krzywa kalibracyjna dla kwasu askorbinowego.

Dla kwasu galusowego krzywa kalibracyjna ma następującą postać:

$$I, \% = 34381x + 0,87 \quad (r^2 = 0,9990) \quad (13)$$



Rys.45. Krzywa kalibracyjna dla kwasu galusowego.

Tak uzyskane wyniki przeliczono na równoważnik mg kwasu askorbinowego lub mg kwasu galusowego/1 g suchej masy ziół. Dokładne dane liczbowe przedstawiono w tabeli 14.

W wyniku przeprowadzonej ilościowej analizy spektrofotometrycznej z użyciem odczynnika DPPH stwierdzono, że wszystkie przebadane gatunki tymianku wykazują właściwości przeciwutleniające. Gatunki charakteryzujące się największymi zdolnościami antyoksydacyjnymi to *T. serpyllum* 'albus', *T. serpyllum* 'aureus' oraz *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* (odpowiednio 48,04, 39,25 i 38,93 mg KA/1 g suchej masy ziół oraz 15,39, 12,44 i 12,33 mg KG/1 g suchej masy ziół), natomiast najmniejszymi gatunki *T. citriodorus* 'golden dwarf' i *T. praecox* 'pygmaeus' (odpowiednio 12,24 i 17,04 mg KA/1 g suchej masy ziół oraz 3,37 i 4,98 mg KG/1 g suchej masy ziół). Następnie uzyskane dane doświadczalne porównano z danymi literaturowymi. W literaturze można znaleźć wiele materiałów dotyczących oceny zdolności antyoksydacyjnych ekstraktów tymianku [340-345]. Sposoby analizy ilościowej użyte przez różnych autorów różnią się, dlatego porównanie otrzymanych wartości z materiałami dostępnymi w literaturze byłoby możliwe tylko wtedy, gdyby przeprowadzone eksperymenty były wykonane w takich samych warunkach. Niestety dokładny przegląd literaturowy pokazał, iż nie jest możliwe znalezienie wspólnego mianownika umożliwiającego porównanie zdolności antyoksydacyjnych roślin leczniczych.

Tab.14. Wyniki analizy właściwości przeciwutleniających dla poszczególnych gatunków tymianku trzema wybranymi metodami analitycznymi z zastosowaniem jako źródło wolnych rodników odczynnika DPPH.

Gatunek	EPR	UV-Vis		test dot blot
	mg TEAC/1g suchej masy ziół (RSD [%])	mg KA / 1g suchej masy ziół (RSD [%])	mg KG / 1g suchej masy ziół (RSD [%])	mg KG / 1g suchej masy ziół (RSD [%])
1. <i>T. vulgaris</i>	85,60 (1,79)	28,33 (1,99)	8,77 (2,16)	25,97 (10,13)
2. <i>T. serpyllum</i>	74,13 (5,61)	24,73 (3,35)	7,56 (3,68)	32,54 (12,13)
3. <i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	133,00 (2,50)	39,25 (3,32)	12,44 (3,52)	45,26 (3,47)
4. <i>T. kosteleckyanus</i>	77,07 (2,08)	27,62 (1,61)	8,53 (1,75)	44,38 (2,96)
5. <i>T. citriodorus</i> ‘golden dwarf’ ziele	33,61 (9,67)	17,68 (5,61)	5,19 (6,49)	25,53 (3,33)
6. <i>T. marschallianus</i>	74,54 (6,41)	19,85 (3,51)	5,92 (3,22)	30,79 (6,53)
7. <i>T. degenii</i>	106,55 (2,59)	29,15 (2,45)	9,05 (2,65)	41,75 (7,49)
8. <i>T. pseudolanuginosus</i>	97,88 (2,86)	30,47 (3,68)	9,49 (2,80)	33,86 (10,28)
9. <i>T. pannonicus</i>	99,43 (2,76)	24,87 (5,23)	7,61 (5,83)	36,49 (3,60)
10. <i>T. austriacus</i>	94,47 (2,86)	22,18 (3,66)	6,71 (3,62)	37,36 (4,60)
11. <i>T. praecox</i> ‘pygmaeus’	58,53 (2,53)	17,04 (6,34)	4,98 (7,30)	20,70 (12,70)
12. <i>T. tiflisiensis</i>	88,31 (0,75)	24,09 (3,58)	7,35 (3,95)	36,05 (3,04)
13. <i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	74,47 (2,07)	27,99 (3,85)	8,66 (4,17)	29,47 (13,63)
14. <i>T. citriodorus</i> ‘golden dwarf’ korzeń	56,61 (3,68)	12,24 (8,56)	3,37 (8,15)	11,94 (13,17)
15. <i>T. serpyllum</i> ‘aureus’	133,38 (1,03)	38,93 (7,03)	12,33 (5,13)	49,64 (5,30)
16. <i>T. serpyllum</i> ‘albus’	137,53 (3,15)	48,03 (2,85)	15,39 (2,99)	60,16 (7,57)
17. <i>T. serpyllum</i>	77,75 (6,30)	22,59 (3,56)	6,84 (3,94)	31,23 (9,99)
18. <i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i>	74,78 (1,03)	18,79 (2,86)	5,57 (3,30)	35,17 (3,74)

#### 9.4. Spektrofotometria UV-Vis z zastosowaniem odczynnika ABTS

Analizę spektrofotometryczną wykonano przy użyciu spektrofotometru UV-Vis model V-530. Dla każdego pomiaru absorbancji w zakresie światła widzialnego wykorzystano 1 cm szklane kuwety. W celu określenia zdolności antyoksydacyjnych wybranych ekstraktów tymianku oraz substancji wzorcowych (kwas askorbinowy - KA i kwas galusowy - KG) wykorzystano roztwór ABTS uzyskując absorbancje na poziomie  $0,70 \pm 0,02$  przy długości fali  $\lambda = 734$  nm. Przed analizą przygotowano roztwór kationorodnika, poprzez rozpuszczenie w stosunku molowym  $7 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> :  $2,54 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> ABTS z nadsiarczanem amonu. Całość pozostawiono na 16 h w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej. Po upływie określonego czasu roztwór rozcieńczono metanolem w celu uzyskania odpowiedniej absorbancji ( $0,7 \pm 0,02$ ) przy długości fali  $\lambda = 734$  nm. Następnie przeprowadzono oznaczenie zdolności antyoksydacyjnych. Mieszanina reakcyjna zawierała 50  $\mu$ L ekstraktu oraz 5 mL roztworu ABTS. Absorbancję mierzono po upływie 10 minut przy długości fali  $\lambda = 740$  nm. Dla każdego z ekstraktów wykonano trzy powtórzenia. Wyniki przedstawiono jako mg substancji wzorcowej na 1 g suchego materiału roślinnego. Procent inhibicji został obliczony za pomocą wzoru:

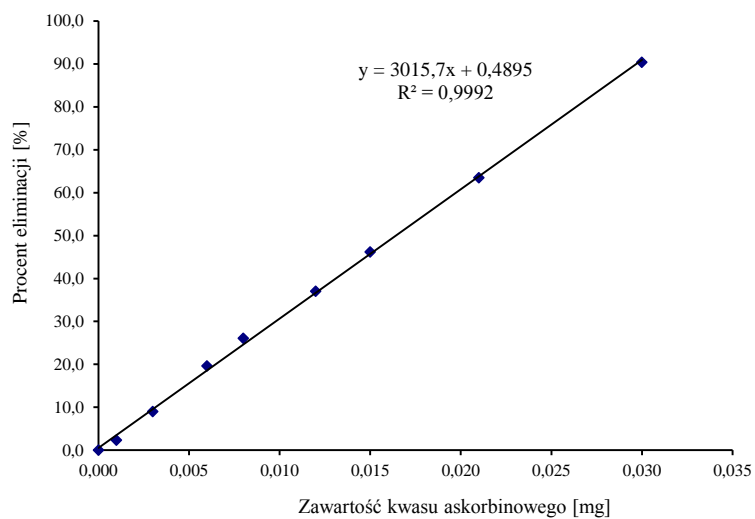
$$I, \% = [(Abs_{ABTS} - Abs_{PRÓBK})/Abs_{ABTS}] \times 100 \quad (14)$$

gdzie:  $Abs_{ABTS}$  - początkowa absorbancja rozcieńczonego roztworu ABTS,

$Abs_{PRÓBK}$  - absorbancja badanych próbek po 10 minutach trwania reakcji.

Wyniki uzyskane dla poszczególnych ekstraktów tymianku wyrażono jako równoważnik kwasu askorbinowego i kwasu galusowego, przy użyciu odpowiednich krzywych kalibracyjnych. W przedstawionych poniżej równaniach x równa się odpowiednio zawartości kwasu askorbinowego i kwasu galusowego w mg. Dla kwasu askorbinowego krzywa kalibracyjna ma następującą postać:

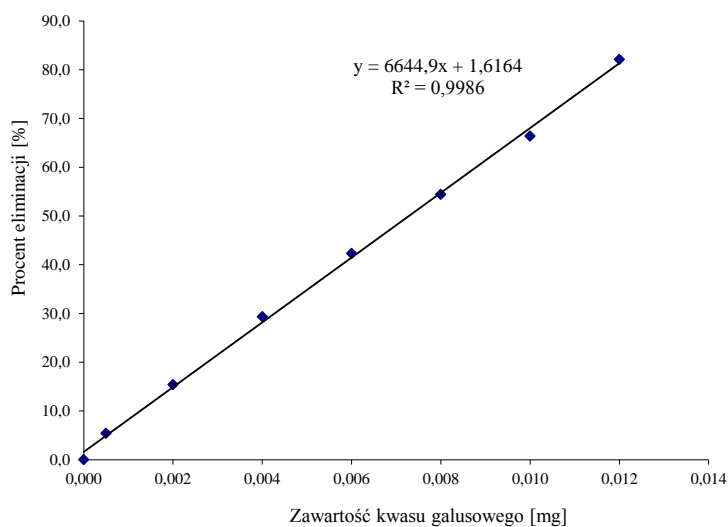
$$I, \% = 3015,7 x + 0,49 \quad (r^2 = 0,999) \quad (15)$$



Rys.46. Krzywa kalibracyjna dla kwasu askorbinowego.

Dla kwasu galusowego krzywa kalibracyjna ma następującą postać:

$$I, \% = 6644,9 x + 1,62 \quad (r^2 = 0,999) \quad (16)$$



Rys.47. Krzywa kalibracyjna dla kwasu galusowego.

Tak uzyskane wyniki przeliczono jako równoważnik mg kwasu askorbinowego lub mg kwasu galusowego/1 g suchej masy ziół. Dokładne dane liczbowe przedstawiono w tabeli 15.

Tab.15. Wyniki analizy właściwości przeciwutleniających dla poszczególnych gatunków tymianku przy pomocy spektrofotometrii UV-Vis z zastosowaniem jako źródło wolnych rodników odczynnika ABTS.

Gatunek	UV-Vis	
	mg KA/1g suchej masy ziół (RSD [%])	mg KG/1g suchej masy ziół (RSD [%])
1. <i>T. vulgaris</i>	31,89 (1,19)	14,13 (1,23)
2. <i>T. serpyllum</i>	34,25 (1,97)	15,21 (2,03)
3. <i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	40,37 (0,57)	18,02 (0,58)
4. <i>T. kosteleckyanus</i>	37,43 (0,60)	16,68 (0,61)
5. <i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' ziele	29,12 (1,55)	12,86 (1,62)
6. <i>T. marschallianus</i>	36,61 (1,13)	16,30 (1,17)
7. <i>T. degenii</i>	38,84 (1,58)	17,32 (1,63)
8. <i>T. pseudolanuginosus</i>	40,91 (0,23)	18,27 (0,16)
9. <i>T. pannonicus</i>	39,88 (1,03)	17,80 (1,06)
10. <i>T. austriacus</i>	38,04 (0,30)	16,95 (0,30)
11. <i>T. praecox</i> 'pygmaeus'	33,64 (2,66)	14,94 (2,75)
12. <i>T. tiflisiensis</i>	40,31 (1,06)	18,00 (1,09)
13. <i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	39,52 (0,97)	17,63 (1,00)
14. <i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' korzeń	32,75 (5,03)	14,53 (5,20)
15. <i>T. serpyllum</i> 'aureus'	44,25 (0,82)	19,81 (0,84)
16. <i>T. serpyllum</i> 'albus'	42,59 (0,48)	19,04 (0,49)
17. <i>T. serpyllum</i>	38,36 (1,73)	17,10 (1,78)
18. <i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i>	35,93 (1,80)	15,99 (1,85)

W wyniku przeprowadzonej analizy spektrofotometrycznej z użyciem odczynnika ABTS stwierdzono, że wszystkie przebadane gatunki tymianku wykazują właściwości przeciwutleniające. Otrzymane wartości dla kwasu askorbinowego znajdują się w zakresie od 29,12 do 44,25 mg KA/1 g suchej masy zioła, natomiast dla kwasu galusowego od 12,86 do 19,81 mg KG/1 g suchej masy zioła. Gatunki charakteryzujące się największymi zdolnościami antyoksydacyjnymi to *T. serpyllum* 'albus' i *T. serpyllum* 'aureus' (odpowiednio 44,25 i 42,59 mg KA/1 g suchej masy ziół oraz 19,04 i 19,81 mg KG/1 g suchej masy ziół), natomiast najmniejszymi gatunki *T. citriodorus* 'golden dwarf' i *T. vulgaris* (odpowiednio 29,12 i 31,89 mg KA/1 g suchej masy ziół oraz 12,86 i 14,13 mg KG/1 g suchej masy ziół).

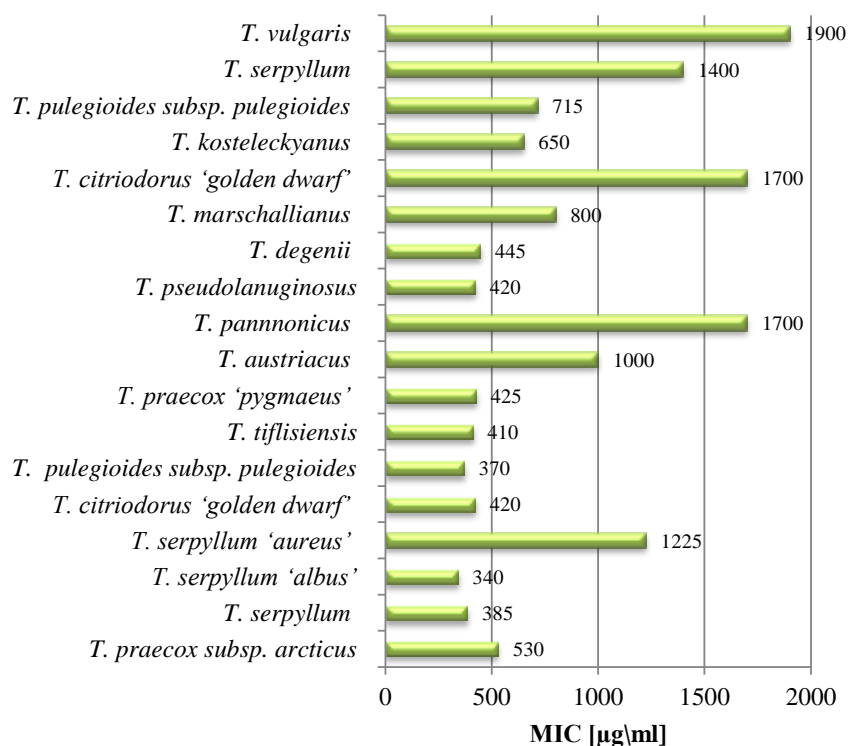
## 10. Analiza właściwości przeciwnowotworowych dla wybranych gatunków tymianku

W pierwszym etapie analizy odpowiednio przygotowano uzyskane w optymalnych warunkach ekstrakcji ASE próbki. W tym celu ekstrakty przesączono przez Anotop<sup>TM</sup> 25 Plus (0,02  $\mu\text{m}$ ). Następnie tak przygotowane próbki przeznaczono do analizy. Jako model nowotworu wybrano komórki ludzkiego raka okrężnicy HCT116, jako wystarczająco reprezentatywny dla interakcji ze składnikami diety. Ponadto wykorzystano komórki prawidłowe NHDF typu fibroblastów wyizolowane ze skóry. Wszystkie linie zostały pozyskane z banku ATCC (ang. American Type Culture Collection).

Komórki hodowano w pożywce DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) F12, zawierającej 12% surowicy płodów wołowych w przypadku linii HCT116, oraz 15% surowicy płodów wołowych, nieinaktywowanej w przypadku linii NHDF. Pożywka zawierała również antybiotyk (gentamycyne) w ilościach 100  $\mu\text{g/mL}$  pożywki. Hodowle komórkowe przechowywane były w inkubatorach o stałej zawartości  $\text{CO}_2$  (5%) i wilgotności (95%). Temperatura wnętrza ciepłarki wynosiła 37°C. W celu utrzymania hodowli komórki pasażowano przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny. Doświadczenia na komórkach *in vitro* prowadzone były w warunkach sterylnych.

Ekstrakty roślinne liofilizowano i rozpuszczono w wodzie, następnie rozcieńczono w medium w celu osiągnięcia wymaganego stężenia. Wykładniczo rosnące komórki zbierano poprzez trypsynizację z hodowli subkonfluentnych. Komórki wysiewano w stężeniu  $5,0 \times 10^3$  komórek na dołek do 96- dołkowych płytek i hodowano przez 18 godzin. Po tym czasie pożywkę hodowlaną wymieniono na medium zawierające ekstrakty w zakresie stężeń od 0,1 do 2,0  $\text{mg/mL}$ . Komórki inkubowano z ekstraktami przez 72h. Następnie pożywkę zastąpiono 100  $\mu\text{L}$  DMEM bez czerwieni fenolowej. Aktywność metaboliczną żywych komórek oznaczono przez dodanie 20  $\mu\text{L}$  CellTiter 96® AQueous One Solution - MTS do każdego dołka, a następnie inkubowano przez 1 godzinę. Test MTS jako kolorymetryczna metoda, stosowany jest do określenia liczby zdolnych do życia komórek. Roztwór wzorcowy zawierający 100  $\mu\text{L}$  DMEM bez czerwieni fenolowej i 20  $\mu\text{L}$  roztworu MTS zastosowano jako ślepą próbę. Po czasie inkubacji zmierzono absorbancję powstałego formazanu przy długości fali  $\lambda = 490 \text{ nm}$ , za pomocą czytnika płytek wielodołkowych Synergy4. Minimalne stężenie hamujące (MIC) określono jako stężenie ekstraktu zdolnego do zredukowania wzrostu komórek o 50% populacji. Każdy poszczególny ekstrakt tymianku badano w trzech powtórzeniach w jednym eksperymencie, przy czym każdy eksperyment był powtarzany od 3 do 5 razy.





Rys.48. Porównanie właściwości przeciwnowotworowych dla wszystkich przebadanych gatunków tymianku.

W wyniku przeprowadzonej analizy przy pomocy testu MTS stwierdzono, że wszystkie przebadane gatunki tymianku wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Dokładne wartości przedstawiono w tabeli 16. Jak można zaobserwować, uzyskane wartości są stosunkowo niskie (nie przekraczają wartości 200 µg/mL), ponadto są bardzo zróżnicowane dla poszczególnych próbek. Ekstraktem, który hamował największą liczbę komórek raka jest *T. serpyllum* 'albus' (340 µg/mL). Natomiast gatunkiem wykazującym najmniejsze zdolności przeciwnowotworowe okazał się gatunek *T. vulgaris*, dla którego wartość MIC wyniosła 1900 µg/mL (jest to ponad 5 razy większa wartość, niż w przypadku gatunku *T. serpyllum* 'albus'). Ciekawą zależność można zauważyć dla gatunku *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele i korzeń. Aktywność przeciwnowotworowa jest 4 razy większa dla próbki otrzymanej z liści (1700 µg/mL), niż w przypadku próbki otrzymanej z korzenia (420 µg/mL). Podobnie dla gatunku *T. serpyllum*. Dla odmiany 'aureus' zaobserwowano 3 razy większe wartości MIC, niż w przypadku odmiany 'albus' (odpowiednio 1225 µg/mL i 340 µg/mL).

Tab.16. Wyniki analizy właściwości przeciwrakowych dla poszczególnych gatunków tymianku przy pomocy testu MTS.

Gatunek	MIC[μg/mL] (RSD [%])
1. <i>T. vulgaris</i>	1900 (4,62)
2. <i>T. serpyllum</i>	1400 (8,14)
3. <i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	715 (1,71)
4. <i>T. kosteleckyanus</i>	650 (3,03)
5. <i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' ziele	1700 (8,29)
6. <i>T. marschallianus</i>	800 (0,89)
7. <i>T. degenii</i>	445 (11,32)
8. <i>T. pseudolanuginosus</i>	420 (4,43)
9. <i>T. pannonicus</i>	1700 (0,26)
10. <i>T. austriacus</i>	1000 (0,63)
11. <i>T. praecox</i> 'pygmaeus'	425 (3,23)
12. <i>T. tiflisiensis</i>	410 (0,13)
13. <i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	370 (0,13)
14. <i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' korzeń	420 (2,53)
15. <i>T. serpyllum</i> 'aureus'	1225 (3,61)
16. <i>T. serpyllum</i> 'albus'	340 (1,64)
17. <i>T. serpyllum</i>	385 (17,4)
18. <i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i>	530 (1,90)

## **11. Wyniki analizy właściwości biologicznych wybranych gatunków tymianku**

W wyniku przeprowadzenia bioautograficznego testu dot blot, analizy właściwości przeciwutleniających trzema metodami analitycznymi z zastosowaniem odczynnika DPPH i ABTS oraz przeprowadzenia przeciwnowotworowego testu MTS stwierdzono, iż wszystkie przebadane gatunki tymianku wykazują takie właściwości. Dokładne dane i ich porównanie przedstawiono w tabeli 17.

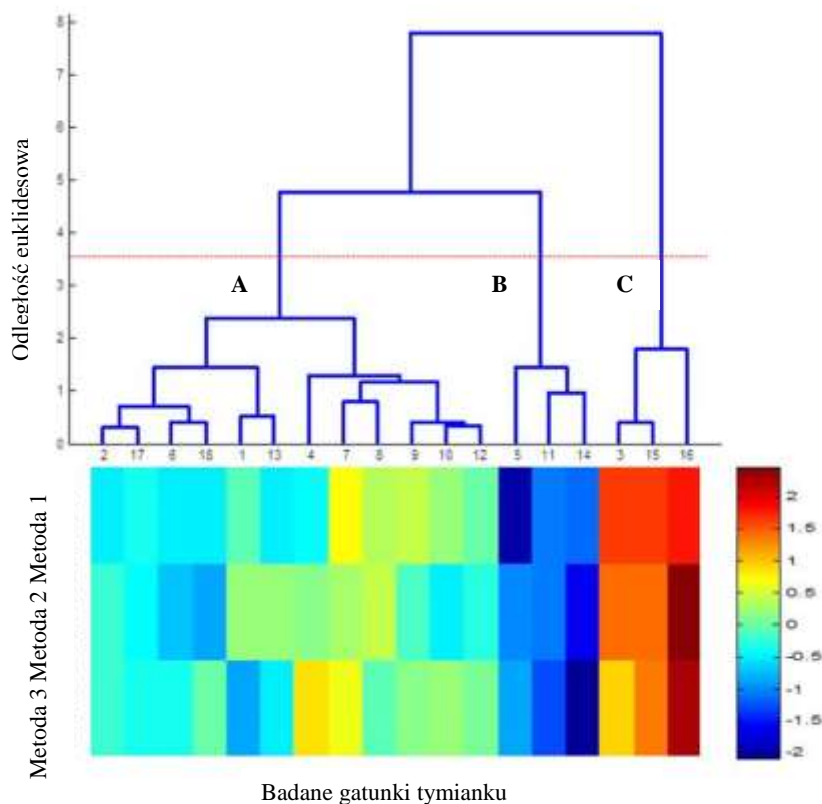
Tab.17. Porównanie wyników poszczególnych gatunków tymianku dla przebadanych właściwości biologicznych.

Lp.	Właściwości przeciwutleniające						Właściwości przeciwnowotworowe	Właściwości przeciwbakteryjne
	EPR	UV-Vis				test dot blot	HCT-116	DB-TLC
	DPPH	DPPH		ABTS		DPPH		
	mg TEAC/1g suchej masy	mg KG / 1g suchej masy	mg KA / 1g suchej masy	mg KG / 1g suchej masy	mg KA / 1g suchej masy	mg KG / 1g suchej masy	MIC	Strefy zahamowania [cm <sup>2</sup> ]
1	85,6	8,77	28,33	14,13	31,89	25,97	0,0005	0,35
2	74,13	7,56	24,73	15,21	34,25	32,54	0,0007	0,88
3	133	12,44	39,25	18,02	40,37	45,26	0,0014	0,43
4	77,07	8,53	27,62	16,68	37,43	44,38	0,0015	1,05
5	33,61	5,19	17,68	12,86	29,12	25,53	0,0006	1,44
6	74,54	5,92	19,85	16,3	36,61	30,79	0,0013	1,3
7	106,55	9,05	29,15	17,32	38,84	41,75	0,0022	0,38
8	97,88	9,49	30,47	18,27	40,91	33,86	0,0024	0,99
9	99,43	7,61	24,87	17,8	39,88	36,49	0,0006	0,79
10	94,47	6,71	22,18	16,95	38,04	37,36	0,0010	0,89
11	58,53	4,98	17,04	14,94	33,64	20,7	0,0024	0,96
12	88,31	7,35	24,09	18	40,31	36,05	0,0024	0,99
13	74,47	8,66	27,99	17,63	39,52	29,47	0,0027	0,6
14	56,61	3,37	12,24	14,53	32,75	11,94	0,0024	0,78
15	133,38	12,33	38,93	19,81	44,25	49,64	0,0008	0,82
16	137,53	15,39	48,03	19,04	42,59	60,16	0,0029	0,85
17	77,75	6,84	22,59	17,1	38,36	31,23	0,0026	0,84
18	74,78	5,57	18,79	15,99	35,93	35,17	0,0019	0,87

## 12. Analiza chemometryczna właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwutleniających oraz przeciwnowotworowych

### 12.1. Analiza chemometryczna właściwości przeciwutleniających

W celu porównania zdolności antyoksydacyjnych poszczególnych gatunków tymianku otrzymanych trzema metodami analitycznymi (test dot blot, EPR oraz spektrofotometria UV-Vis) zastosowano grupowanie hierarchiczne. Wyniki przeprowadzonej analizy chemometrycznej otrzymano dla danych autoskalowanych i przedstawiono na rysunku 49.

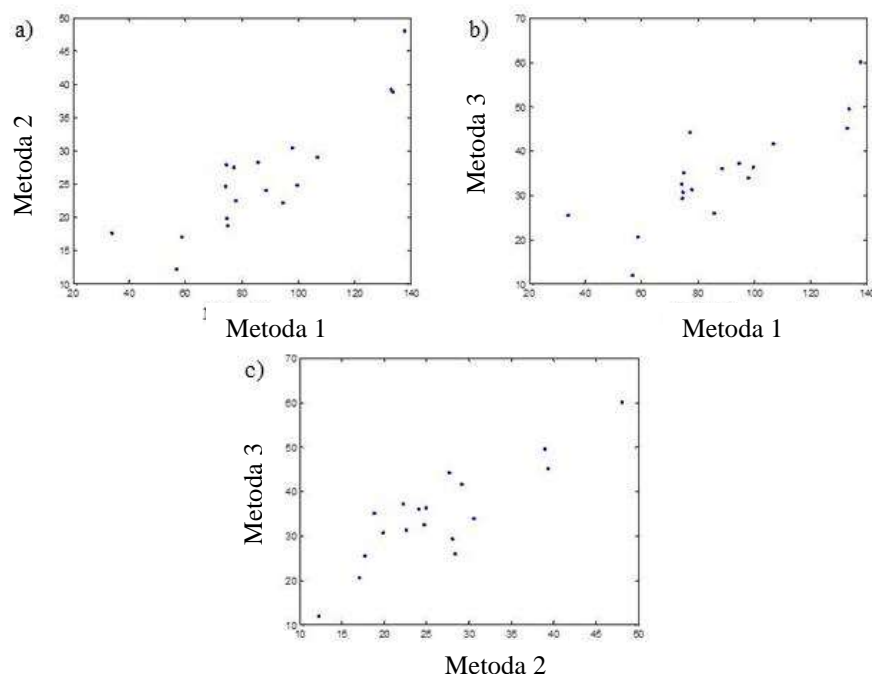


Rys.49. Dendrogram wybranych gatunków tymianku oraz ich właściwości przeciwutleniających otrzymanych trzema metodami analitycznymi: metoda 1 - spektroskopia EPR, metoda 2 - spektrofotometria UV-Vis, metoda 3 - test dot blot.

Dendrogram przedstawiony na rysunku 49 dla osiemnastu przebadanych gatunków tymianku można podzielić na trzy główne klastry: A, B i C. Do grupy C możemy zaliczyć ekstrakty o numerach 3, 15 i 16. Klaster B zawiera ekstrakty o numerach 5, 11 i 14, natomiast pozostałe 12 ekstraktów możemy zakwalifikować do klastra A, który możemy dalej podzielić na grupy A1 i A2. Ekstrakty trzech gatunków zaliczone do klastra C różnią się najbardziej od pozostałych badanych próbek. Rozszerzona mapa ciepła pokazuje, że te trzy gatunki charakteryzują się największymi zdolnościami antyoksydacyjnymi. Zaobserwowano, że dwa spośród trzech omawianych gatunków (ekstrakty numer 15 i 16), są ze sobą ściśle powiązane, ponieważ są reprezentowane przez ten sam gatunek *T. serpyllum*, lecz inne jego odmiany (odpowiednio 'aureus' i 'albus'). Kolejna grupa ekstraktów (klaster B) zawierająca próbki numer 5, 11 i 14, po przeanalizowaniu mapy ciepła, wykazuje najniższe właściwości przeciwutleniające. próbki oznaczone numerami 5 i 14 należą do tego samego gatunku, *T. citriodorus* 'golden dwarf', ale zostały pozyskane z różnych części rośliny - liście i korzeń. Można zatem wnioskować, że cała roślina charakteryzuje się niskim potencjałem antyoksydacyjnym. Pozostałe 12 ekstraktów zaliczających się do klastra A (próbki numer 1, 2, 4, 6-10, 12, 13, 17 i 18) charakteryzuje się średnimi właściwościami przeciwutleniającymi (wyższymi niż gatunek *T. citriodorus*, a niższymi niż gatunek *T. serpyllum*).

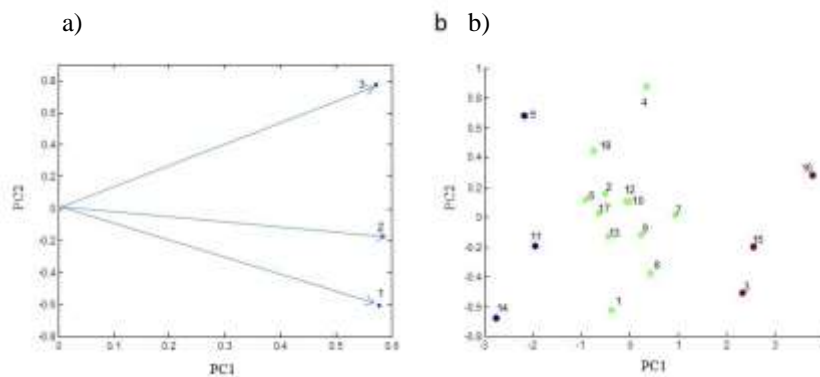
Różne kolory na mapie ciepła, opisujące zdolności antyoksydacyjne dla poszczególnych gatunków tymianku mierzonych trzema metodami analitycznymi, są prawie identyczne lub bardzo zbliżone do siebie nawzajem, niezależnie od stosowanej techniki pomiarowej. Przykładem mogą być ekstrakty numer 15 i 16 o barwie pomarańczowo-brązowej (pomimo różnic w intensywności koloru). Charakteryzują się one największymi zdolnościami antyoksydacyjnymi. Przeciwnie, ekstrakty 5, 11 i 14 posiadają barwę niebieską (również o różnej intensywności barwy), co wskazuje na najniższe właściwości przeciwutleniające wśród próbek. Analogiczne zależności kolorów obserwujemy dla wyciągów tymianku, które charakteryzują się pośrednimi zdolnościami antyoksydacyjnymi.

Związek między zdolnościami przeciwutleniającymi dla badanych gatunków tymianku mierzony trzema różnymi metodami analitycznymi przedstawiono na rysunku 50. Współczynnik korelacji dla metody 1 (spektroskopia EPR) i metody 2 (spektrofotometria UV-Vis) wynosi 0,88, metody 1 (spektroskopia EPR) i metody 3 (test dot blot) 0,83, natomiast dla metody 2 (spektrofotometria UV-Vis) i metody 3 (test dot blot) 0,86.



Rys.50. Relacje pomiędzy właściwościami antyoksydacyjnymi badanych gatunków tymianków mierzonymi trzema metodami analitycznymi: a) metoda 1 (spektroskopia EPR) i metoda 2 (spektrofotometria UV-Vis), b) metoda 1 (spektroskopia EPR) i metoda 3 (test dot blot) oraz c) metoda 2 (spektrofotometria UV-Vis) i metoda 3 (test dot blot).

Dla omawianych wyników przeprowadzono analizę czynników głównych (PCA), w wyniku której wybrano dwie główne składowe: PC1 opisującą 91,64% oraz PC2 opisującą 4,58% wariancji danych.



Rys.51. Wyniki PCA: a) projekcja parametrów (1 - spektroskopia EPR, 2 - spektrofotometria UV-Vis, 3 - test dot blot), b) projekcja przebadanych gatunków tymianku w płaszczyźnie wyznaczonej przez składowe PC1 i PC2.

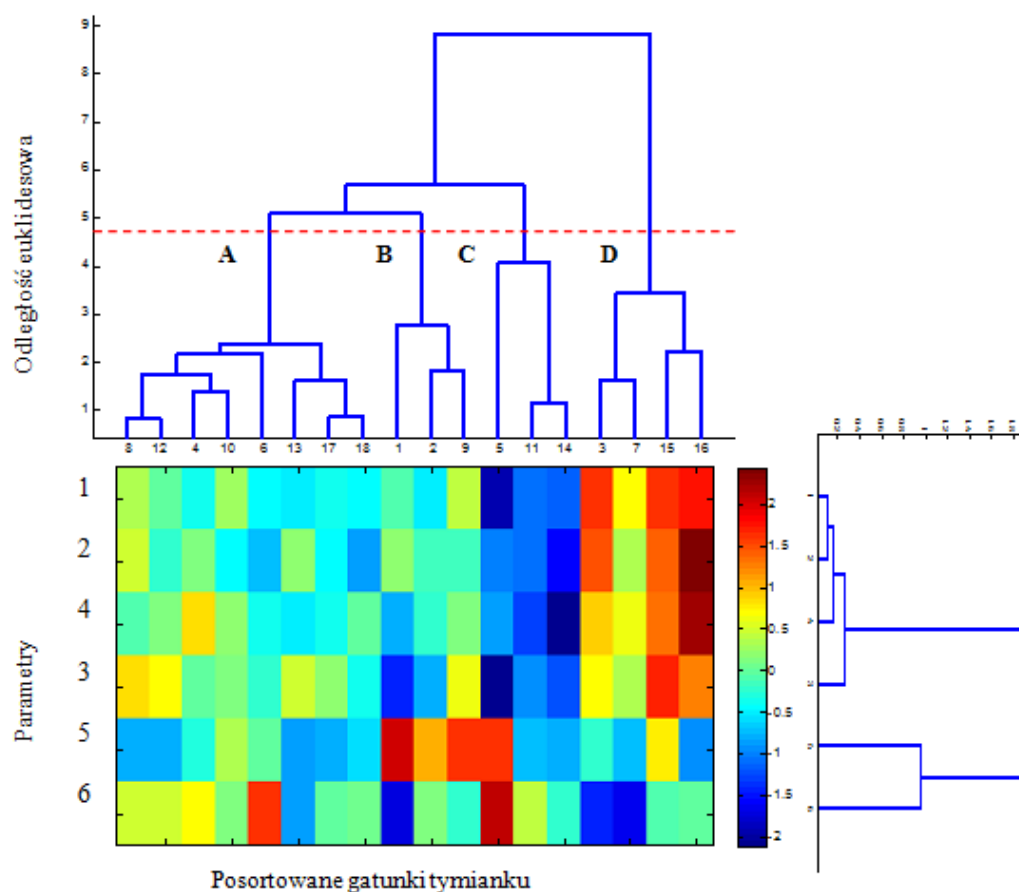
W projekcji parametrów (zastosowane techniki analityczne, rys.51a.) składowa PC1 odzwierciedla wysoką dodatnią korelację pomiędzy porównywanymi metodami, natomiast składowa PC2 opisuje małe różnice zaobserwowane dla metody EPR (1) i testu dot blot (3). Projekcja próbek na płaszczyznę wyznaczoną przez PC1 i PC2 (rys.51b.) pozwala na porównanie właściwości przeciwutleniających poszczególnych gatunków tymianku. Trzy różne kolory wykorzystywane są do oznaczania próbek należących do trzech klastarów (A, B i C) zgodnie z wcześniej omawianym dendrogramem.

## **12.2. Analiza chemometryczna badanych właściwości biologicznych**

Celem niniejszej analizy było porównanie aktywności antyoksydacyjnej, antibakteryjnej i przeciwnowotworowej dla poszczególnych gatunków tymianku, a przede wszystkim stwierdzenie, czy między tymi trzema różnymi rodzajami aktywności biologicznej istnieją zależności. Metody oznaczone numerami 1-4 dotyczą zdolności przeciwutleniających, metoda 5 właściwości przeciwnowotworowych, natomiast 6 przeciwbakteryjnych. Porównanie to przeprowadzono przy pomocy grupowania hierarchicznego oraz analizy czynników głównych.

Wyniki analizy przeprowadzonej metodą grupowania hierarchicznego zostały przedstawione na rysunku 52. Metoda ta została zastosowana zarówno do porównania między sobą osiemnastu badanych gatunków tymianku, jak i wyników sześciu rodzajów przeprowadzonych metod analitycznych.





Rys.52. Dendrogram przedstawiający badane gatunki tymianku pod względem ich właściwości biologicznych. Parametry oznaczone numerami 1-4 dotyczą zdolności przeciwutleniających, 5 właściwości przeciwnowotworowych, natomiast 6 przeciwbakteryjnych.

Parametry zostały uszeregowane zgodnie ze stopniem ich skorelowania z wykorzystaniem metody Word'a. Na podstawie uzyskanego dendrogramu, skupiając się na porównaniu między sobą osiemnastu przebadanych gatunków tymianku, możemy zaobserwować tworzenie się czterech głównych klastrow (A, B, C i D). Klaster A zawiera ekstrakt o numerach 4, 6, 8, 10, 12, 13, 17 oraz 18. W skład grupy B wchodzi próbki tymianków o numerach 1, 2 i 9, natomiast w skład grupy C próbki o numerach 5, 11, 14. W ostatnim wyodrębnionym klastrze D, stwierdzono obecność ekstraktów 3, 7, 15 oraz 16. Wzbogacając naszą interpretację danych o mapę ciepła możemy zauważyć ciekawe zależności pomiędzy ekstraktami w poszczególnych klastrach.

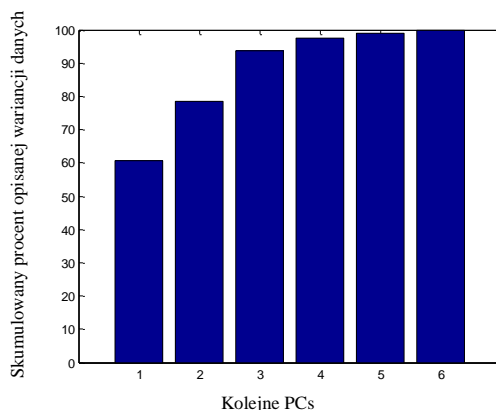
Jak można zaobserwować gatunki należące do klastra D wykazują największe zdolności antyoksydacyjne. Dodatkowo spośród nich można wyodrębnić dwie próbki o najsilniejszych właściwościach przeciwutleniających (próbka nr 15 i 16), które można przypisać temu samemu gatunkowi *T. serpyllum*, lecz różnej jego odmianie ('aureus' oraz 'albus').

W skład grupy C wchodzi gatunki, które charakteryzują się najmniejszymi zdolnościami antyoksydacyjnymi. Jak można zauważyć próbki 5 i 14 należą do tego samego gatunku (*T. citriodorus* 'golden dwarf'), jednak w badaniach wykorzystano różne jego części - liście i korzeń. Dodatkowo próbka o numerze 5 charakteryzuje się silnymi właściwościami przeciwbakteryjnymi.

Dla grupy B (próbki o nr 1, 2 i 9) zaobserwowano najwyższe wartości uzyskane w wyniku analizy zdolność przeciwnowotworowej, co świadczy o tym, że gatunki te charakteryzują się najsłabszymi właściwościami przeciwnowotworowymi. Próbki, które charakteryzują największe zdolności przeciwnowotworowe, to próbki numer: 16 (*T. serpyllum* 'albus'), 17 (*T. serpyllum*) oraz 13 (*T. pulegioides*), które zakwalifikowano do różnych klastrow.

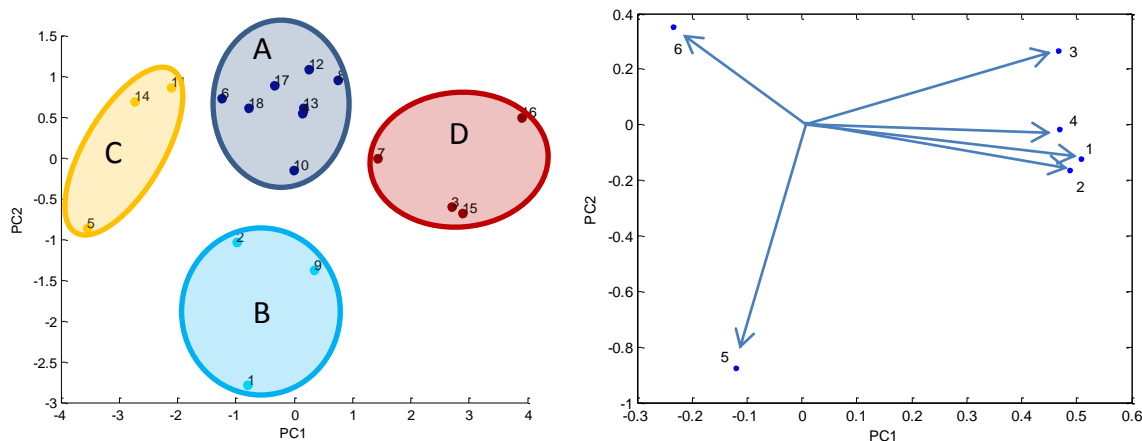
Próbki tworzące grupę A charakteryzują średnie wartości badanych właściwości biologicznych. Wyjątek stanowi próbka o numerze 6 (*T. marschallianus*), dla której zaobserwowano wysokie właściwości przeciwbakteryjne oraz 17 (*T. serpyllum*) i 13 (*T. pulegioides*), dla których zaobserwowano najwyższe właściwości przeciwnowotworowe.

Do zobrazowania zależności pomiędzy próbkami i mierzonymi parametrami zastosowano analizę czynników głównych. Bazując na założeniu, że zmienność związana jest z zasobem informacji zawartej w danych, wyznaczono czynniki główne zawierające możliwie największą część zmienności występujących w analizowanych danych. Kumulacyjny procent wariancji danych opisanych przez pierwsze sześć czynników głównych przedstawia rys.53.



Rys.53. Skumulowany procent opisanej wariancji danych przy kolejnych PCs.

Pierwsze dwa czynniki główne opisują znaczną część całkowitej wariancji danych (78,58%). Projektacja danych na przestrzeń zdefiniowaną przez pierwsze dwa czynniki główne (PC1, PC2) pozwala zauważyć wzajemne położenie obiektów względem siebie.



Rys.54. Projektacja a) obiektów, b) parametrów na przestrzeń opisaną przez pierwsze dwa czynniki główne.

Projektacja przebadanych gatunków tymianku (obiektów) pod kątem ich różnych właściwości biologicznych na płaszczyznę zdefiniowaną przez dwie pierwsze główne składowe (PC1 i PC2), pokazuje grupowanie tych gatunków w cztery odrębne klastery (A, B, C i D) - rysunek 54a. W identyczny sposób zostały sklasyfikowane poszczególne gatunki za pomocą wcześniej opisanej metody chemometrycznej - grupowanie hierarchiczne.

Projekcja parametrów zdefiniowana przez dwie pierwsze główne składowe, PC1 i PC2 (rys.54b) pokazuje różny stopień ich skorelowania. Parametry 1-4 opisujące zdolności antyoksydacyjne są silnie skorelowane między sobą. Po dokładnym przeanalizowaniu danych możemy zauważyć, że parametry 1, 2, 4 są nieznacznie zróżnicowane między sobą. Metody opisujące wymienione parametry jako źródło wolnych rodników wykorzystwały odczynnik DPPH, niemniej jednak wykorzystwały one różne substancje wzorcowe (kwas galusowy, trolox). Parametry te natomiast bardziej odbiegają od parametru 3, dla którego wyniki zostały uzyskane przy użyciu odczynnika ABTS, z zastosowaniem kwasu galusowego jako substancji wzorcowej.

Natomiast parametry 1-4 są skorelowane ujemnie względem parametru 6, określającego właściwości przeciwbakteryjne. Oznacza to, że ekstrakty wykazujące silne właściwości przeciwutleniające posiadają niskie właściwości przeciwbakteryjne i na odwrót. Wymienione właściwości biologiczne nie są natomiast skorelowane z parametrem 5 (zdolności przeciwnowotworowe) ze względu na kąt pomiędzy wektorami, bliski  $90^\circ$ .

### 13. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań, stwierdzono iż:

- ✓ W wyniku przeprowadzenia wieloetapowej ekstrakcji otrzymano sześć frakcji związków fenolowych.
- ✓ W wyniku analizy TLC z detekcją densytometryczną oraz HPLC (z zastosowaniem dwóch detektorów DAD oraz ELSD) skonstruowano fingerprinty dla poszczególnych gatunków i odmian z rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*).
- ✓ Stwierdzono, iż frakcja aglikonów flawonoidowych najbardziej różnicuje przebadane rośliny należące do rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*), natomiast frakcja kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej, wolnych kwasów fenolowych oraz octanowa frakcja glikozydów flawonoidowych różnicują je najslabiej.
- ✓ Na podstawie analizy GC-MS stwierdzono, że skład jakościowy olejków eterycznych otrzymanych techniką analizy fazy nadpowierzchniowej jest bogatszy, niż otrzymanych podczas destylacji z parą wodną w aparacie Derynga dla badanych gatunków tymianku.
- ✓ Dla wszystkich przebadanych gatunków tymianku zidentyfikowano tylko jeden wspólny związek lotny:  $\beta$ -linalol. Tylko 10 spośród 20 badanych gatunków tymianku w składzie frakcji lotnej zawierało mieszaninę izomerów: tymol i/lub karwakrol.
- ✓ Analiza chemometryczna danych otrzymanych z analizy chromatograficznej gatunków tymianku pozwoliła wyodrębnić 3 grupy, różniące się składem frakcji lotnej.
- ✓ Stosując centralny plan kompozycyjny wyznaczono optymalne warunki prowadzenia ekstrakcji ASE: temperatura 130°C, rozpuszczalnik metanol - woda, 27:73 v/v.
- ✓ Zawartość związków fenolowych w ekstraktach otrzymanych w optymalnych warunkach z zastosowaniem ekstrakcji ASE jest wyższa, niż w przypadku ekstraktów otrzymanych ekstrakcją w aparacie Soxhleta,
- ✓ Stosując dwustopniowy model ANOVA stwierdzono, że cztery gatunki tymianku, tj. *T. pulegioides*, *T. kosteleckyanus*, *T. citriodorus* oraz *T. marschallianus* różnią się od pozostałych dwóch: *T. vulgaris* i *T. serpyllum*, zawartością związków fenolowych.
- ✓ W wyniku przeprowadzenia bioautograficznego testu dot blot stwierdzono, iż wszystkie osiemnaście przebadanych ekstraktów tymianku wykazuje właściwości przeciwbakteryjne. Gatunki, które wykazały największe właściwości przeciwbakteryjne to *T. citriodorus* 'golden dwarf' ziele oraz *T. marschallianus*, natomiast najmniejsze *T. vulgaris* i *T. degenii*.

- ✓ Analizując właściwości przeciwutleniające trzema metodami analitycznymi z zastosowaniem odczynnika DPPH oraz ABTS stwierdzono, że wszystkie przebadane gatunki tymianku wykazują zdolności antyoksydacyjne. Dwie odmiany gatunku *T. serpyllum* ('albus' i 'aureus') charakteryzowały się największymi właściwościami, podczas gdy gatunek *T. citriodorus* "golden dwarf" najmniejszymi.
- ✓ W wyniku analizy chemometrycznej danych otrzymanych z badań zdolności antyoksydacyjnych wybranych gatunków tymianku z zastosowaniem odczynnika DPPH, podzielono badane gatunki na trzy grupy (o najmniejszych, średnich oraz największych właściwościach przeciwutleniających).
- ✓ W wyniku przeprowadzenia testu przeciwnowotworowego MTS stwierdzono, iż wszystkie przebadane gatunki tymianku wykazują takie właściwości. Gatunki wykazujące największe zdolności przeciwnowotworowe to *T. serpyllum*, *T. serpyllum* 'albus' i *T. pulegioides*, natomiast najmniejsze *T. vulgaris*.
- ✓ Analiza chemometryczna otrzymanych wyników (grupowanie hierarchiczne i analiza czynników głównych) wykazała, że właściwości biologiczne dla badanych gatunków tymianku są różne.

## 14. Finansowanie

Badania, które są przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane dzięki wsparciu finansowemu pochodzącemu z takich źródeł jak:

- ✓ Zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych,
- ✓ Dotacji z młodych naukowców finansowanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego,
- ✓ Unijnego programu stypendialnego realizowanego w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - DoktoRIS - Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska.



## 15. Dorobek naukowy

### 15.1. Publikacje naukowe

1. D. Staszek, **M. Orłowska**, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, Marker fingerprints originating from TLC and HPLC for selected plants for *Lamiaceae* family, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36 (2013) 2463-2475.
2. D. Staszek, **M. Orłowska**, J. Rzepa, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, Fingerprint of selected *Thymus* species by HS-GC-MS analysis of their volatile fraction, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 97 (5) (2014) 1250-1258.
3. **M. Orłowska**, I. Stanimirova, D. Staszek, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Optimization of extraction based on the thin-layer chromatographic fingerprints of common thyme, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 97 (5) (2014) 1274-1281.
4. **M. Orłowska**, W. Jesionek, B. Majer-Dziedzic, I.M. Choma, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, M. Sajewicz, A comparison of antibacterial activity of selected thyme (*Thymus*) species by means of the dot blot test with direct bioautographic detection, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 98 (4) (2015) 871-875.
5. **M. Orłowska**, K. Pytlakowska, M. Bartoszek, J. Polak, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, Antioxidant activity of selected thyme (*Thymus* L.) species and an equivalence of different measuring methodologies, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 98 (4) (2015) 876-882.
6. **M. Orłowska**, K. Pytlakowska, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, A comparison of antioxidant, antibacterial, and anticancer activity of the selected thyme species by means of Hierarchical Clustering and Principal Component Analysis, *Acta Chromatographica*.

### 15.2. Wystąpienia ustne

1. **M. Orłowska**, D. Staszek, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Contemplating chemotaxonomy on a flower-bed of the thyme species, III Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Plant - the source of research material”, Lublin, 16-18 październik 2013



**2. M. Orłowska**, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, Opracowanie nowej, prostej metody porównywania zdolności antyoksydacyjnych ekstraktów roślinnych, X Konferencja Chromatograficzna, Lublin, 23-26 wrzesień 2014

### 15.3. Plakaty

**1. M. Sajewicz**, D. Staszek, **M. Cieřlik**, A. Kołaczekiewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Analiza zawartości związków fenolowych w dwóch gatunkach szalwii (*Salvia triloba* i *Salvia staminea*) oraz w dwóch gatunkach tymianku (*Thymus serpyllum* L. i *Thymus vulgaris* L.) technikami TLC, HPLC/DAD i HPLC/ELSD, VI Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 18 maj 2012

**2. M. Sajewicz**, D. Staszek, **M. Cieřlik**, A. Kołaczekiewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, A TLC, HPLC/DAD and HPLC/ELSD study of the phenolics contained in two sage (*Salvia triloba* i *Salvia staminea*) and in two thyme species (*Thymus serpyllum* L. i *Thymus vulgaris* L.), XXXV Sympozjum Naukowe nt. „Chromatograficzne metody badania związków organicznych, Szczyrk, 30-01 maj-czerwiec 2012

**3. D. Staszek**, **M. Cieřlik**, A. Perek, A. Kołaczekiewicz, M. Weloe, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, Chromatographic fingerprinting of the phenolics acids and flavonoids fractions in the selected species of sage, thyme and dragonshead, II Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa “Plant the source of research material”, Lublin 18-20 październik 2012

**4. D. Staszek**, **M. Cieřlik**, A. Perek, A. Kołaczekiewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, The HPLC fingerprinting of the phenolic acids and flavonoids fractions derived from the selected species of sage, thyme and dragonshead, 3rd FUCUB ERA Workshop „Food Chemistry and Biochemistry”, Belgrad (Serbia), 26-28 listopad 2012

**5. M. Orłowska**, D. Staszek, M. Sajewicz, T. Kowalska, Zastosowanie różnych metod detekcji do porównywania fingerprintów ekstraktów roślinnych uzyskanych różnymi metodami, 30 Wiosenny Zjazd Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Przewięż pod Augustowem, 11-14 kwiecień 2013

**6. M. Orłowska**, D. Staszek, K. Rykulska, S. Słomczyńska, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Porównanie różnych metod wyodrębniania związków fenolowych z roślin na przykładzie tymianku pospolitego (*Thymus vulgaris*), VII Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 17 maj 2013

**7. D. Staszek**, **M. Orłowska**, J. Rzepa, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, Porównanie efektywności zastosowanych technik wyodrębniania związków lotnych w wybranych gatunkach tymianku (*Thymus* L.), VII Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 17 maj 2013

- 8. M. Orłowska**, I. Stanimirova, D. Staszek, K. Rykulska, S. Słomczyńska, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, A comparison of the plant extraction methods upon an example of common thyme (*Thymus vulgaris*), XXXVI Sympozjum Naukowe nt. „Chromatograficzne metody badania związków organicznych”, Szczyrk, 05-07 czerwiec 2013
- 9. D. Staszek, M. Orłowska**, J. Rzepa, G. Szymczak, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, Analysis of volatile fraction from selected thyme (*Thymus* L.) species by means of GC-MS and HS-GC-MS, XXXVI Sympozjum Naukowe nt. „Chromatograficzne metody badania związków organicznych”, Szczyrk, 05-07 czerwiec 2013
- 10. M. Orłowska**, I. Stanimirova, D. Staszek, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Extraction of phenolic acids from common thyme by means of Soxhlet apparatus and accelerated solvent extraction (ASE), 9th Balaton Symposium On High-Performance Separation Methods, Siófok (Węgry), 04-06 wrzesień 2013
- 11. D. Staszek, M. Orłowska**, M.S. Wróbel, J. Rzepa, G. Szymczak, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, Comparison of two methods of extracting volatile fraction and comparative analysis of the volatile fraction composition for eighteen thyme (*Thymus* L.) species by means of HS-GC-MS, 9th Balaton Symposium On High-Performance Separation Methods, Siófok (Węgry), 04-06 wrzesień 2013
- 12. M. Orłowska**, I. Stanimirova, D. Staszek, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Ekstrakcja kwasów fenolowych dla gatunku tymianek pospolity za pomocą aparatu Soxhleta i przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem, V-te Podlaskie Spotkanie Chromatograficzne, Reymontówka-Kotuń/Chlewiska, 15-18 wrzesień 2013
- 13. M. Orłowska**, M.S. Wróbel, J. Rzepa, G. Szymczak, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, Porównanie efektywności dwóch technik wyodrębniania związków lotnych oraz porównanie składu frakcji lotnej w osiemnastu gatunkach tymianku (*Thymus* L.) techniką HS-GC-MS, V-te Podlaskie Spotkanie Chromatograficzne, Reymontówka-Kotuń/Chlewiska, 15-18 wrzesień 2013
- 14. M. Orłowska**, D. Staszek, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Zależność intensywności fluorescencji od długości fali dla ekstraktów otrzymanych dla gatunku *Thymus vulgaris*, Pomiedzy Naukami - II ogólnopolska konferencja dla studentów i doktorantów, Chorzów, 27 wrzesień 2013
- 15. M. Orłowska**, D. Staszek, M. Sajewicz, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, A comparison of total phenolic acids in different thyme (*Thymus* L.) species by means of TLC, III Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Plant - the source of research material”, Lublin, 16-18 październik 2013

- 16. D. Staszek, M. Orłowska, M.S. Wróbel, J. Rzepa, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,** Investigation of the efficiency of the volatile fraction isolation techniques and a comparison of the composition of these fractions for eighteen thyme (*Thymus* L.) species by use of HS-GC-MS, III Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa „Plant - the source of research material”, Lublin, 16-18 październik 2013
- 17. M. Orłowska, M. Sajewicz, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Macierzanka piaskowa (*Thymus serpyllum* L.)** - zawartość związków fenolowych w zależności od odmiany gatunku oraz miejsca hodowli, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka, Łódź, 7 grudnia 2013
- 18. M. Orłowska, M. Sajewicz, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,** Porównanie zawartości związków fenolowych w różnych gatunkach tymianku (*Thymus* L.) techniką HPLC-DAD, X Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Chromatografia Jonowa 2014”, Zabrze, 9-10 kwiecień 2014
- 19. M. Orłowska, M. Sajewicz, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,** Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych gatunków tymianku techniką TLC przy użyciu DPPH, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Zawoja, 9-13 kwiecień 2014
- 20. M. Orłowska, J. Antczak, W. Czarnecka, K. Gęborska, M. Seroka, M. Bartoszek, J. Polak, K. Pytlakowska, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, M. Sajewicz,** Analiza właściwości antyoksydacyjnych dla różnych gatunków tymianku wybranymi technikami analitycznymi metodą redukcji rodnika DPPH, VIII Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 16 maj 2014
- 21. M. Orłowska, M. Sajewicz, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,** A comparison of the phenolics content in different thyme species by means of HPLC-ELSD, 9<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Product, Lublin, 26-29 maj 2014
- 22. M. Orłowska, J. Antczak, W. Czarnecka, K. Gęborska, M. Seroka, M. Bartoszek, J. Polak, K. Pytlakowska, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, M. Sajewicz,** Anti-oxidative properties of different thyme species checked by means of different analytical techniques involving reduction of DPPH radical, XXXVII Sympozjum Naukowe nt. „Chromatograficzne metody badania związków organicznych”, Szczyrk, 11-13 czerwiec 2014
- 23. M. Orłowska, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, M. Sajewicz,** Determination of antioxidant properties of different thyme species by means of dot-blot test, 7<sup>th</sup> Central European Conference “Chemistry towards Biology”, Chorzów, 9-12 wrzesień 2014

- 24. M. Orłowska**, M. Bartoszek, J. Polak, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, Oznaczanie zdolności antyoksydacyjnych wybranych gatunków tymianku przy pomocy spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego, Pomiędzy Naukami - III ogólnopolska konferencja dla studentów i doktorantów, Chorzów, 26 wrzesień 2014
- 25. M. Orłowska**, K. Pytlakowska, M. Bartoszek, J. Polak, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Sajewicz, On standardization of Antioxidant activity measurements with medicinal plant extract, VI Serbian Congress of Pharmacy, Belgrad (Serbia), 15-19 październik 2014
- 26. M. Orłowska**, K. Pytlakowska, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, M. Sajewicz, Analiza właściwości antyoksydacyjnych wybranych gatunków tymianku przy pomocy techniki spektrofotometrii UV-Vis z zastosowaniem odczynnika DPPH, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław, 13 grudzień 2014
- 27. M. Orłowska**, W. Jesionek, B. Majer-Dziedzic, I.M. Choma, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, M. Sajewicz, Bioautografia jako metoda oznaczania właściwości przeciwbakteryjnych wybranych gatunków tymianku, IX Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 15 maj 2015
- 28. M. Orłowska**, W. Jesionek, B. Majer-Dziedzic, I.M. Choma, G. Szymczak, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, M. Sajewicz, Bioautography as a method of determination of antibacterial properties with selected thyme species, XXXVIII Sympozjum Naukowe nt. „Chromatograficzne metody badania związków organicznych”, Szczecin, 26-29 maj 2015
- 29. M. Orłowska**, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, M. Sajewicz, Badanie składu jakościowego i ilościowego wybranych gatunków tymianku oraz ich właściwości biologicznych, Pomiędzy Naukami - IV Ogólnopolska Konferencja dla studentów i doktorantów, Chorzów, 18 wrzesień 2015

## V. Curriculum Vitae



Marta Orłowska

Adres: ul. Fliegera 14/19

40-060 Katowice

Tel.: 694-638-301

Email: m.orłowska.us@gmail.com

Data i miejsce urodzenia: 16.07.1989 Ogrodzieniec

### WYKSZTAŁCENIE

2012 -	Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, studia doktoranckie, kierunek: chemia
2012 - 2013	Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, kierunek chemia leków, studia II stopnia, stopień naukowy: magister
2011 - 2012	Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, kierunek chemia ogólna, studia II stopnia, stopień naukowy: magister
2008 - 2011	Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, kierunek chemia leków, studia I stopnia, stopień naukowy: licencjat
2007 - 2010	Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, kierunek chemia ogólna, studia I stopnia, stopień naukowy: licencjat
2004 - 2007	IV Liceum Ogólnokształcące im. Krzysztofa Kamila Baczyńskiego w Olkuszu profil Biologiczno - Chemiczny

### CELE ZAWODOWE

Rozwój naukowy oraz zdobycie doświadczenia w pracy zespołowej

### DOŚWIADCZENIE ZAWODOWE

07.2009	Praktyka w Głównym Instytucie Górnictwa w Katowicach
---------	--

### JĘZYKI

Język angielski - poziom średnio zaawansowany

Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych zawartych w mojej ofercie pracy dla potrzeb niezbędnych do realizacji procesu rekrutacji (zgodnie z ustawą z dn. 29.08.97 roku o Ochronie Danych Osobowych Dz. Ust Nr 133 poz. 883)

## VI. Literatura

- [1] J. Lutomski, The significance of herbs in therapy and dietetics, *Postępy Fitoterapii* 2/3 (2001) 3-8.
- [2] J. Fronczak, *Rodzinna encyklopedia zdrowia, Przegląd Reader's Digest*, Warszawa, 2001.
- [3] „Stan i perspektywy rozwoju upraw zielarskich oraz kierunki ich wykorzystania”, Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich, Polski Komitet Zielarski.
- [4] C. A. Stace, *Taksonomia roślin i biosystematyka*, PWN, Warszawa 1993
- [5] W. Buchwald, D. Szczyglewska, Tymianek pospolity - tradycyjna roślina lecznicza i przyprawowa, *Wiadomości Zielarskie* 41 (1999) 9-10.
- [6] L. Rubió, A. Serra, A. Macià, X. Borràs, M.P. Romero, M.J. Motilva, Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 905 (2012) 75-84.
- [7] S.J. Lee, K. Umamo, T. Shibamoto, K.G. Lee, Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties, *Food Chemistry* 91 (2005) 131-137.
- [8] B. Boros, S. Jakabová, Á. Dörnyei, G. Horváth, Z. Pluhár, F. Kilár, A. Felinger, Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7972-7980.
- [9] A. Ożarowski, W. Jaroniewski, *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*, Wydaw. IWZZ, Warszawa, 1987.
- [10] D. Kluszczyńska, Lecznicze właściwości tymianku, *Wiadomości Zielarskie* 43 (2001) 13-16.
- [11] M. Wspaniała, Tymianek pospolity - *Thymus vulgaris* L., *Ekonatura* 6 (2004) 13-14.
- [12] T. Lewkowicz-Mosiej, *Leksykon roślin leczniczych, Świat Książki*, Warszawa, 2003.
- [13] J. Muszyński, *Ziołolecznictwo i leki roślinne: fitoterapia*, PZWL, Warszawa, 1954.
- [14] O.R. Pereira, A.M. Peres, A.M.S. Silva, M.R.M. Domingues, S.M. Cardoso, Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC-UV and ESI-MS combined method, *Food Research International* 54 (2013) 1773-1780.
- [15] S.Y. Oh, J.W. Ko, S.Y. Jeong, J. Hong, Application and exploration of fast gas chromatography-surface acoustic wave sensor to the analysis of thymus species, *Journal of Chromatography A* 1205 (2008) 117-127.
- [16] A. Szweykowska, J. Szweykowski, *Systematyka*, PWN, Warszawa, 2009.
- [17] E. Pisulewska, Z. Janeczko, *Krajowe rośliny olejkowe: występowanie, uprawa, skład chemiczny, zastosowanie, Know-How*, Kraków, 2008.
- [18] H. Strzelecka, J. Kowalski, *Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa*, PWN, Warszawa, 2000.
- [19] S. Janicki, A. Fiebig, *Farmacja stosowana: podręcznik dla studentów farmacji*, PZWL, Warszawa, 2001.
- [20] J. Steinbrich, O tymianku prawie wszystko, *Wiadomości Zielarskie* 37 (1995) 1-2.
- [21] A. Cerda, M.E. Martínez, C.Soto, P. Poirrier, J.R. Perez-Correa, J.R. Vergara-Salinas, M.E. Zúñiga, The enhancement of antioxidant compounds extracted from *Thymus vulgaris* using enzymes and the effect of extracting solvent, *Food Chemistry* 139 (2013) 138-143.
- [22] M.D. Guillen, M.J. Manzanos, Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymes vulgaris* L. plant, *Food Chemistry* 63 (1998) 373-383.
- [23] M. Corticchiato, A. Bernardini, J. Costa, C. Bayet, A. Saunois, B. Voirin, Free flavonoid aglycones from *Thymus herba barona* and its monoterpene chemotypes, *Phytochemistry* 40 (1995) 115-120.

- [24] M.J. Jordan, R.M. Martinez, C. Martinez, I. Monino, J.A. Sotomayor, Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels, *Industrial crops and products* 29 (2009) 145-153.
- [25] B. Hlava, F. Stary, F. Pospisil, *Rośliny kosmetyczne*, Państw. Wydaw. Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1984.
- [26] M. Pustkowski, *Leksykon zdrowia: rośliny lecznicze, minerały, suplementy i witaminy*, Park, Bielsko-Biała, 2006.
- [27] K. Jędrzejko, B. Kowalczyk, B. Bacler, *Rośliny kosmetyczne*, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, 2007.
- [28] I. Fecka, S. Turek, Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques, *Food Chemistry* 108 (2008) 1039-1053.
- [29] P. Ody, *Wielki zielnik medyczny*, Debit, Bielsko-Biała, 1999.
- [30] [http://pl.wikipedia.org/wiki/Macierzanka\\_tymianek](http://pl.wikipedia.org/wiki/Macierzanka_tymianek)
- [31] W. Jaroniewski, *Macierzanka piaskowa - roślina lecznicza i przyprawowa*, *Wiadomości Zielarskie* 36 (1994) 9-10.
- [32] A.I. Hussain, F. Anwar, S.A.S. Chatha, S.Latif, S.T.H. Sherazi, A. Ahmad, J. Worthington, S.D. Sarker, Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora, *LWT - Food Science and Technology* 50 (2013) 185-192.
- [33] B. Broda, J. Mowszowicz, *Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych*, PZWL, Warszawa, 2000.
- [34] K. Lozien, P.R. Venskutonis, A. Sipailien, J. Labokas, Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes, *Food Chemistry* 103 (2007) 546-559.
- [35] M. Pardo de Santayana, E. Blanco, R. Morales, Plants known as te in Spain: An ethno-pharmacobotanical review, *Journal of Ethnopharmacology* 98 (2005) 1-19.
- [36] A. Sarwa, *Wielki leksykon roślin leczniczych*, Książka i Wiedza, Warszawa, 2001.
- [37] I. Jabri-Karoui, I. Bettaieb, K. Msaada, M. Hammami, B. Marzouk, Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*, *Journal of Functional Foods* 4 (2012) 661 -669.
- [38] O.R. Pereira, R.I.R. Macias, M.J. Perez, J.J.G. Marin, S.M. Cardoso, Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* L. and *Thymus citriodorus* on liver cells, *Journal of Functional Foods* 5 (2013) 1170 - 1179.
- [39] M. Malewska, *Niezwykły świat zapachów*, *Wiadomości Zielarskie* 42 (2000) 12.
- [40] A. Djilani, A. Dicko, The therapeutic benefits of essential oils, *Nutrition, Well-Being and Health* (2012) 155-178.
- [41] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils - A review, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446-475.
- [42] K.A. Hammer, C.F. Carson, Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: H. Thormar, (Ed.), *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. John Wiley&Sons, Ltd, UK.
- [43] J. Góra, A. Lis, *Najcenniejsze olejki eteryczne*, Wydaw. Uniwersytetu M. Kopernika, Toruń, 2005.
- [44] M. Adaszyńska, M. Swarczewicz, Essential oils as an active ingredients or preservatives in cosmetics, *Wiadomości chemiczne* 66 (2012) 1-2.
- [45] E.R. Adlard, *Handbook of essential oils. Science, technology and applications*, *Chromatographia* 72 (2010) 1021.

- [46] J.R. Calo, P.G. Crandall, C.A. O'Bryan, S.C. Ricke, Essential oils as antimicrobials in food systems - A review, *Food Control* 54 (2015) 111-119.
- [47] J. Kączkowski, *Podstawy biochemii*, WNT, Warszawa, 2012.
- [48] S. Katarzyna-Król, K. Skalicka-Woźniak, M. Kandefer-Szerszeń, A. Stepulak, The biological and pharmacological activity of essential oils in the treatment and prevention of infectious diseases, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67 (2013) 1000-1007.
- [49] B. Prakash, A. Kedia, P.K. Mishra, N.K. Dubey, Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges, *Food Control* 47 (2015) 381-391.
- [50] A. Astani, J. Reichling, P. Schnitzler, Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils, *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* ID 253643 (2011) 1-8.
- [51] A.I. Hussain, F. Anwar, S.T. Hussain Sherazi, R. Przybylski, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations, *Food Chemistry* 108 (2008) 986-995.
- [52] P.P. Alvarez-Castellanos, M.J. Pascual-Villalobos, Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain, *Industrial Crops and Products* 17 (2003) 77-81.
- [53] M.M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews* 12 (1999) 564-582.
- [54] R. Klimek, *Olejki eteryczne*, Wydawnictwo Przemysłu Lekkiego i Spożywczego, Warszawa, 1957.
- [55] B. Khorrami, A.R. Vakili, M.D. Mesgaran, F. Klevenhusen, Thyme and cinnamon essential oils: Potential alternatives for monensin as a rumen modifier in beef production systems, *Animal Feed Science and Technology* 200 (2015) 8-16.
- [56] K.P. Svoboda, R.I. Greenaway, Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties, *The International Journal of Aromatherapy* 13 (2003) 196-202.
- [57] A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H. Aït Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F.N.R. Renaud, A. Elaissari, Essential oils: From extraction to encapsulation, *International Journal of Pharmaceutics* 483 (2015) 220-243.
- [58] G.A. Evrendilek, Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 202 (2015) 35-41.
- [59] Y. Chang, L. McLandsborough, D.J. McClements, Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate), *Food Chemistry* 172 (2015) 298-304.
- [60] D. Aouadi, G. Luciano, V. Vasta, S. Nasri, D.M.R. Brogna, S. Abidi, A. Priolo, H.B. Salem, The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of *Artemisia herba alba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, *Meat Science* 97 (2014) 237-243.
- [61] T. Jiang, Z. Luo, T. Ying, Fumigation with essential oils improves sensory quality and enhanced antioxidant ability of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), *Food Chemistry* 172 (2015) 692-698.
- [62] M. Zuzarte, M.J. Goncalves, C. Cavaleiro, M.T. Cruz, A. Benzarti, B. Marongiu, A. Maxia, A. Piras, L. Salgueiro, Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils, *Industrial Crops and Products* 44 (2013) 97- 103.
- [63] C. Cabral, J. Pocas, M.J. Goncalves, C. Cavaleiro, M.T. Cruz, L. Salgueiro, *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil, *Industrial Crops and Products* 65 (2015) 56-61.



- [64] M. Mashigo, S. Combrinck, T. Regnier, W. Du Plooy, W. Augustyn, N. Mokgalaka, Chemical variations, trichome structure and antifungal activities of essential oils of *Helichrysum splendidum* from South Africa, *South African Journal of Botany* 96 (2015) 78-84.
- [65] T. Stevic, T. Beric, K. Savikin, M. Sokovic, D. Godevac, I. Dimkic, S. Stankovic, Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant, *Industrial Crops and Products* 55 (2014) 116-122.
- [66] M. Nikolic, J. Glamoclija, I.C.F.R. Ferreira, R.C. Calhelha, Â. Fernandes, T. Markovic, D. Markovic, A. Giweli, M. Sokovic, Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils, *Industrial Crops and Products* 52 (2014) 183- 190.
- [67] M. Nikolic, K.K. Jovanovic, T. Markovic, D. Markovic, N. Gligorijevic, S. Radulovic, M. Sokovic, Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils, *Industrial Crops and Products* 61 (2014) 225-232.
- [68] M.R.F. Gomes, R.S. Schuh, A.L.B. Jacques, G.G. Dorneles, J. Montanha, P.M. Roehe, S. Bordignon, E. Dallegrave, M.B. Leal, R. Pereira Limberger, Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*, *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23 (2013) 284-290.
- [69] A. Turmagambetova, N. Sokolova, I. Zaitceva, M. Alexyuk, A. Bogoyavlenskiy, V. Berezin, Essential oils as antiviral preparations, *Journal of Biotechnology* 208 (2015) 93.
- [70] *Farmakopea Polska V*. Tom V. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 1999.
- [71] A. Kędzia, Evaluation of the susceptibility anaerobic bacteria to thyme oil, *Postępy Fitoterapii* 3 (2006) 131-135.
- [72] A. Kędzia, B. Dera-Tomaszewska, M. Ziółkowska-Klinkosz, A.W. Kędzia, B. Kochańska, A. Gębska, Activity of thyme oil (*Oleum Thymi*) against aerobic bacteria, *Postępy Fitoterapii* 2 (2012) 67-71.
- [73] M. Sienkiewicz, M. Wasiela, Activity of thyme and lavender essential oils against antibiotic resistant clinical bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Postępy Fitoterapii* 3 (2012) 139-145.
- [74] L. Llorens, J.A. Llorens-Molina, S. Agnello, H. Boira, Geographical and environment-related variations of essential oils in isolated populations of *Thymus richardii* Pers. in the Mediterranean basin, *Biochemical Systematics and Ecology* 56 (2014) 246-254.
- [75] G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, *Food Chemistry* 91 (2005) 621-632.
- [76] S. Bounatirou, S. Smiti, M.G. Miguel, L. Faleiro, M.N. Rejeb, M. Neffati, M.M. Costa, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link., *Food Chemistry* 105 (2007) 146-155.
- [77] El mokhtar El Ouariachi, I. Hamdani, A. Bouyanzer, B. Hammouti, L. Majidi, J. Costa, J. Paolini, A. Chetouani, Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4 (2014) 281-286.
- [78] R.J. de Carvalho, G.T. de Souza, V. Gonçalves Honorio, J. Pereira de Sousa, M.L. da Conceição, M. Maganani, E.L. de Souza, Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models, *Food Microbiology* 52 (2015) 59-65.
- [79] X.-Y. Deng, H.-Y. Li, J.-J. Chen, R.-P. Li, R. Qu, Q. Fu, S.-P. Ma, Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice, *Behavioural Brain Research* 291 (2015) 12-19.

- [80] A. Ghasvand, S. Dowlatshah, N. Nouraei, N. Heidari, F. Yazdankhah, A solid-phase microextraction platinized stainless steel fiber coated with a multiwalled carbon nanotube-polyaniline nanocomposite film for the extraction of thymol and carvacrol in medicinal plants and honey, *Journal of Chromatography A* 1406 (2015) 87-93.
- [81] I. Maławska, *Farmakognozja: podręcznik dla studentów farmacji*, Wydaw. Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, 2008.
- [82] K. Bonenberg, Olejki eteryczne w aromaterapii (I), *Aura* 6 (1993) 27-28.
- [83] F. Modrzejewski, *Farmacja stosowana: podręcznik dla studentów farmacji*, PZWL, Warszawa, 1977.
- [84] J. Stępień, *Aromaterapia*, Warszawski Dom Wydawniczy, Warszawa, 1997.
- [85] [http://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Ap\\_Deryngax2.svg](http://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Ap_Deryngax2.svg)
- [86] B. Kędzia, E. Holderna-Kędzia, The microbiological activity of plant terpenes, *Postępy Fitoterapii* 4 (2012) 226-229.
- [87] S.S. Mahmoud, R.B. Croteau, Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants, *Trends in Plant Science* 7 (2002) 366-373.
- [88] J. McMurry, *Chemia organiczna. Cz. 4*, PWN, Warszawa, 2007.
- [89] A. Koszowska, A. Dittfeld, A. Puzoń-Brończyk, J. Nowak, B. Zubelewicz-Szkodzińska, Polyphenols in the prevention of lifestyle diseases, *Postępy Fitoterapii* 4 (2013) 263-266.
- [90] H. El Gharras, Polyphenols: food sources, properties and applications - a review, *International Journal of Food Science and Technology* 44 (2009) 2512-2518.
- [91] A. King, G. Young G., Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, *Journal of the American Dietetic Association* 99 (1999) 213-218.
- [92] V. Cheynier, G. Comte, K.M. Davies, V. Lattanzio, S. Martens, Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology, *Plant Physiology and Biochemistry* 72 (2013) 1-20.
- [93] U. Gawlik-Dziki, Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 4 (2004) 29-40.
- [94] D. Schemeth, J.C. Noël, T. Jakschitz, M. Rainera, R. Tessadri, C.W. Huck, G.K. Bonn, Poly(N-vinylimidazole/ethylene glycol dimethacrylate) for the purification and isolation of phenolic acids, *Analytica Chimica Acta* 885 (2015) 199-206.
- [95] R. Hitayezu, M.M. Baakdah, J. Kinnin, K. Henderson, A. Tsopmo, Antioxidant activity, avenanthramide and phenolic acid contents of oat milling fractions, *Journal of Cereal Science* 63 (2015) 35-40.
- [96] B. Borkowski, Fenolokwasy i ich estry. Cz. I, *Herba Polonica* 39 (1993) 71-83.
- [97] A. Prus, Antioxidant and pharmacological properties of phenolic acids, *Postępy Fitoterapii* 1 (2013) 48-53.
- [98] R.J. Robbins, Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 2866-2887.
- [99] V. Verardo, C. Serea, R. Segal, M.F. Caboni, Free and bound minor polar compounds in oats: Different extraction methods and analytical determinations, *Journal of Cereal Science* 54 (2011) 211-217.
- [100] K.H. Kim, R. Tsao, R. Yang, S.W. Cui, Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions, *Food Chemistry* 95 (2006) 466-473.
- [101] M. Jeszka, E. Flaczyk, J. Kobus-Cisowska, K. Dziedzic, Związki fenolowe - charakterystyka i znaczenie w technologii żywności, *Nauka Przyroda Technologie* 4 (2010) 1-13.
- [102] D. Wojcieszńska, A. Wilczek, Związki fenolowe pochodzenia naturalnego, *Nauka i Technika* 6 (2006) 6-12.

- [103] J.L. Ward, K. Poutanen, K. Gebruers, V. Piironen, A.M. Lampi, L. Nystrom, A.A. M. Andersson, P. Åman, D. Boros, M. Rakszegi, Z. Bedo, P.R. Shewry, The HEALTHGRAIN Cereal Diversity Screen: Concept, Results, and Prospects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 9699-9709.
- [104] J. Klepacka, Ł. Fornal, Związki fenolowe i ich wpływ na jakość piwa (1), *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo - Warzywny* 11 (2004) 6-8.
- [105] J. Kopcewicz, S. Lewak, *Fizjologia roślin*, PWN, Warszawa 2002.
- [106] B. Li, C. Zhang, L. Peng, Z. Liang, X. Yan, Y. Zhu, Y. Liu, Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC-MS and HPLC methods, *Industrial Crops and Products* 69 (2015) 329-334.
- [107] S.A. Heleno, A. Martins, M.J.R.P. Queiroz, I.C.F.R. Ferreira, Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review, *Food Chemistry* 173 (2015) 501-513.
- [108] Z. E. Sikorski, E. Babicz-Zielińska, *Chemia żywności: skład, przemiany i właściwości żywności*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- [109] M. Wspaniała, Substancje biologicznie czynne w ziołach - ich właściwości lecznicze, przyprawowe i konserwujące, *Ekonatura* 1 (2004) 18-21.
- [110] J. Kączkowski, *Biochemia roślin T. 2, Metabolizm wtórny*, PWN, Warszawa 1993.
- [111] G. Budryn, E. Nebesny, Fenolokwasy - ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 2 (2006) 103-110.
- [112] D. Martini, F. Taddei, R. Ciccoritti, M. Pasquini, I. Nicoletti, D. Corradini, M. Grazia D'Egidio, Variation of total antioxidant activity and of phenolic acid, total phenolics and yellow coloured pigments in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) as a function of genotype, crop year and growing area, *Journal of Cereal Science* 65 (2015) 175-185.
- [113] O. Sytar, Phenolic acids in the inflorescences of different varieties of buckwheat and their antioxidant activity, *Journal of King Saud University - Science* 27 (2015) 136-142.
- [114] W. Zhou, H. Xie, X. Xu, Y. Liang, X. Wei, Phenolic constituents from *Isodon lophanthoides* var. *graciliflorus* and their antioxidant and antibacterial activities, *Journal of Functional Foods* 6 (2014) 492-498.
- [115] S. Makwana, R. Choudhary, J. Haddock, Punit Kohli, In-vitro antibacterial activity of plant based phenolic compounds for food safety and preservation, *LWT - Food Science and Technology* 62 (2015) 935-939.
- [116] T.K. Hyun, Y.J. Ko, E.H. Kim, I.M. Chung, J.S. Kim, Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax moribifera* leaf extracts, *Industrial Crops and Products* 74 (2015) 263-270.
- [117] G.X. Ma, X.P. Zhang, P.F. Li, Z.H. Sun, N.L. Zhu, Y.D. Zhu, J.S. Yang, D.L. Chen, H.F. Wu, X.D. Xu, Four new phenolic acid with unusual bicycle [2.2.2] octane moiety from *Clerodendranthus spicatus* and their anti-inflammatory activity, *Fitoterapia* 105 (2015) 61-65.
- [118] H.H. Lin, J.H. Chen, F.P. Chou, C.J. Wang, Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-κB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation, *British Journal of Pharmacology* 162 (2011) 237-254.
- [119] J. Živkovic, J.C.M. Barreira, D. Stojkovic, T. Cebovic, C. Santos-Buelga, Z. Maksimovic, I.C.F.R. Ferreira, Phenolic profile, antibacterial, antimutagenic and antitumour evaluation of *Veronica urticifolia* Jacq., *Journal of Functional Foods* 9 (2014) 192-201.
- [120] B. Borkowski, Fenolokwasy i ich estry. Cz. II, *Herba Polonica* 3 (1993) 139-145.
- [121] T.M. Nickels, A.L. Ingram, D.K. Maraoulaite, R.L. White, Thermogravimetry-mass spectrometry investigations of benzoic acid interactions with sodium and calcium montmorillonites, *Thermochimica Acta* 614 (2015) 157-162.

- [122] D. Wojcieszńska, U. Guzik, P. Jaroszek, Mikrobiologiczny rozkład kwasu galusowego, *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 12 (2009) 173-184.
- [123] S. Verma, A. Singh, A. Mishra, Gallic acid: Molecular rival of cancer, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35 (2013) 473-485.
- [124] M. Molski, *Chemia piękna*, PWN, Warszawa 2009.
- [125] R.M. Hafizur, A. Hameed, M. Shukrana, S.A. Raza, S. Chishti, N. Kabir, R.A. Siddiqui, Cinnamic acid exerts anti-diabetic activity by improving glucose tolerance in vivo and by stimulating insulin secretion in vitro, *Phytomedicine* 22 (2015) 297-300.
- [126] E. Lamer-Zarawska, B. Kowal-Gierczak, J. Niedworok, *Fitoterapia i leki roślinne*, PZWL, Warszawa 2007.
- [127] I. Gulcin, Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), *Toxicology* 217 (2006) 213-220.
- [128] I. Fecka, A. Mazur, W. Cisowski, Rosmarinic acid, a important therapeutic component of some herbal crude drugs, *Postępy Fitoterapii* 102 (2002) 20-25.
- [129] A. Jabłońska-Trypuć, R. Czerpak, *Surowce kosmetyczne i ich składniki: część teoretyczna i ćwiczenia laboratoryjne*, MedPharm Polska, Wrocław 2008.
- [130] M. Moghaddam, L. Mehdizadeh, Variability of total phenolic, flavonoid and rosmarinic acid content among Iranian basil accessions, *LWT - Food Science and Technology* 63 (2015) 535-540.
- [131] Z. Zheng, Y. Sheng, B. Lu, L. Ji, The therapeutic detoxification of chlorogenic acid against acetaminophen-induced liver injury by ameliorating hepatic inflammation, *Chemico-Biological Interactions* 238 (2015) 93-101.
- [132] Y.J. Guo, T. Luo, F. Wu, Y.W. Mei, J. Peng, H. Liu, H.R. Li, S.L. Zhang, J.H. Dong, Y. Fang, L. Zhao, Involvement of TLR2 and TLR9 in the anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in HSV-1-infected microglia, *Life Sciences* 127 (2015) 12-18.
- [133] P. Mróz, K. Wilczek, M. Żak, M. Zielińska-Pisklak, Chromatographic methods of isolation and identification of phenolics acid, *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego WUM* 6 (2012) 40-48.
- [134] A.Č. Mišan, N.M. Mimica-Dukić, A.I. Mandić, M.B. Sakač, I.Lj. Milovanović, I.J. Sedej, Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts, *Central European Journal of Chemistry* 9 (2011) 133-142.
- [135] K.A. Ross, T. Beta, S.D. Arntfield, A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods, *Food Chemistry* 113 (2009) 336-344.
- [136] K. Skalicka-Wozniak, K. Głowniak, Quantitative analysis of phenolic acids in extracts obtained from the fruits of *Peucedanum alsaticum* L. and *Peucedanum cervaria* (L.) Lap, *Chromatographia* 68 (2008) 85-90.
- [137] J. Wang, B. Sun, Y. Liu, H. Zhang, Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran, *Food Chemistry* 150 (2014) 482-488.
- [138] D. Šterbová, D. Matejcek, J. Vlcek, V. Kubán, Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials, *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 435-444.
- [139] J. Vichapong, M. Sookserm, V. Srijesdaruk, P. Swatsitang, S. Srijaranai, High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties, *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010) 1325-1330.
- [140] P. Rangsrirong, N. Rangkadilok, J. Satayavivad, M. Goto, A. Shotipruk, Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. Fruits, *Separation and Purification Technology* 66 (2009) 51-56.

- [141] A. Zaikova, E. Brandsteterova, E. Blahova, Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*, *Journal of Chromatography A* 983 (2003) 271-275.
- [142] G. Dong, J. Xu, Y. Gu, Y. Wei, A general separation method of phenolic acids using pH-zone refining counter-current chromatography and its application to oat bran, *Journal of Chromatography B* 992 (2015) 36-42.
- [143] P. Costa, S. Gonçalves, P. Valentão, P.B. Andrade, N. Coelho, A. Romano, *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity, *Food Chemistry* 135 (2012) 1253-1260.
- [144] S. Kumar, A.K. Pandey, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The ScientificWorld Journal* (2013) 1-16.
- [145] K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (2002) 572-584
- [146] R. Glinka, M. Glinka, *Receptura kosmetyczna z elementami kosmetologii. T. 1*, Oficyna Wydawnicza "MA", Łódź 2008.
- [147] R.J. Nijveldt, E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A.M. van Leeuwen, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *The American Journal of Clinical Nutrition* 74 (2001) 418-425.
- [148] H.K. Sandhar, B. Kumar, S. Prasher, P. Tiwari, M. Salhan, P. Sharma, A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids, *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1 (2011) 25-41.
- [149] U. Małolepsza, H. Urbanek, Plant flavonoids as biochemical active compounds, *Wiadomości Botaniczne* 44 (2000) 27-37.
- [150] A. Domańska, A. Mertas, W. Król, Flavonoids as anti-inflammatory agents in therapy of parodontium diseases, *Postępy Fitoterapii* 1 (2008) 32-36.
- [151] O. Bołonkowska, A. Pietrosiuk, K. Sykłowska-Baranek, Plant dyes, their biological activity and production in in vitro cultures, *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego WUM* 1 (2011) 1-27.
- [152] P.C.H. Hollman, M.B. Katan, Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability, *Food and Chemical Toxicology* 37 (1999) 937-942.
- [153] A. Kobylińska, K.M. Janas, Kwercetyna, ważny flawonoid w życiu roślin, *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych* 64 (2015) 113-127.
- [154] M. Majewska, H. Czacot, Flawonoidy w profilaktyce i terapii, *Terapia i leki* 65 (2009) 369-377.
- [155] M.L. Falcone Ferreyra, S.P. Rius, P. Casati, Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications, *Frontiers in Plant Science* 3 (2012) 1-15.
- [156] B. Winkel-Shirley, Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology, *Plant Physiology* 126 (2001) 485-493.
- [157] V. Cheynier, G. Comte, K.M. Davies, V. Lattanzio, S. Martens, Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology, *Plant Physiology and Biochemistry* 72 (2013) 1-20.
- [158] Ø.M. Andersen, K.R. Markham, *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, USA, 2006.
- [159] S. Kohlmunzer, *Farmakognozja: podręcznik dla studentów farmacji*, PZWL, Warszawa, 1998.
- [160] M. Materska, Wpływ warunków ekstrakcji na zawartość O-glikozydów kwercetyny w preparatach z owoców papryki, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 91 (2013) 139 - 150.
- [161] A. Mishra, S. Kumar, A.K. Pandey, Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*, *The ScientificWorld Journal* (2013) 1-8.

- [162] G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radical Biology & Medicine*, 22 (1997) 749-760.
- [163] M. Funakoshi-Tago, K. Okamoto, R. Izumi, K. Tago, K. Yanagisawa, Y. Narukawa, F. Kiuchi, T. Kasahara, H. Tamura, Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway, *International Immunopharmacology* 25 (2015) 189-198.
- [164] M.J. Tuñón, M.V. García-Mediavilla, S. Sánchez-Campos, J. González-Gallego, Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: Modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways, *Current Drug Metabolism* 10 (2009) 256-271.
- [165] T. Mrozowski, Wątroba - chemiczna fabryka organizmu, *Farmakoterapia* (2010) 8-11.
- [166] W. Zhu, Q. Jia, Y. Wang, Y. Zhang, M. Xia, The anthocyanin cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway, *Free Radical Biology & Medicine* 52 (2012) 314-327.
- [167] M.I. Ammar, G.E. Nenaah, A.H.H. Mohamed, Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi, *Crop Protection* 49 (2013) 21-25.
- [168] H.M. Santos Júnior, V.A.C. Campos, D.S. Alves, A.J. Cavaleiro, L.P. Souza, D.M.S. Botelho, S.M. Chalfoun, D.F. Oliveira, Antifungal activity of flavonoids from *Heteropterys byrsonimifolia* and a commercial source against *Aspergillus ochraceus*: In silico interactions of these compounds with a protein kinase, *Crop Protection* 62 (2014) 107-114.
- [169] L.G. Bahrin, M.O. Apostu, L.M. Birsa, M. Stefan, The antibacterial properties of sulfur containing flavonoids, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 (2014) 2315-2318.
- [170] T.P.T. Cushnie, A.J. Lamb, Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents* 26 (2005) 343-356.
- [171] K. Brusselmans, R. Vrolix, G. Verhoeven, J.V. Swinnen, Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity, *The Journal Of Biological Chemistry* 280 (2005) 5636-5645.
- [172] N.E. Rawson, C.T. Ho, S. Li, Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels, *Food Science and Human Wellness* 3 (2014) 104-109.
- [173] O.V. Carvalho, C.V. Botelho, C.G.T. Ferreira, H.C.C. Ferreira, M.R. Santos, M.A.N. Diaz, T.T. Oliveira, J.A.P. Soares-Martins, M.R. Almeida, A. Silva Júnior, In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: Implications of structural differences for antiviral design, *Research in Veterinary Science* 95 (2013) 717-724.
- [174] D.J. Seo, S.B. Jeon, H. Oh, B.H. Lee, S.Y. Lee, S.H. Oh, J.Y. Jung, C. Choi, Comparison of the antiviral activity of flavonoids against murine norovirus and feline calicivirus, *Food Control* 60 (2016) 25-30.
- [175] A.D. Agrawal, Pharmacological Activities of flavonoids: A review, *International Journal of Pharmaceutical Science and Nanotechnology* 4 (2011) 1394-1398.
- [176] I. Mirończuk-Chodakowska, A. Witkowska, M.E. Zujko, Zawartość flawonoidów w jadalnych grzybach leśnych, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 3 (2012) 665-668.
- [177] J. Jambor, Fitoterapia chorób układu moczowego, *Przegląd Urologiczny* 71 (2012) 23-29.
- [178] M. Zielińska-Pisklak, Ł. Szeleszczuk, A. Młodzianka, Bez czarny (*Sambucus nigra*) domowy sposób nie tylko na grype i przeziębienie, *Lek w Polsce* 23 (2013) 1-4.
- [179] W. Grajek, Rola przeciwutleniaczy w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia, *Żywność.Nauka.TechnologiaJakość* 38 (2004) 3-11.

- [180] A. Bolarinwa, J. Linseisen, Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection, *Journal of Chromatography B* 823 (2005) 143-151.
- [181] R. Tsao, Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients* 2 (2010) 1231-1246.
- [182] N.C. Cook, S. Samman, Flavonoids---Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry* 7 (1996) 66-76.
- [183] S.P. Fernández, C. Wasowski, L.M. Loscalzo, R.E. Granger, G.A.R. Johnston, A.C. Paladini, M. Marder, Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides, *European Journal of Pharmacology* 539 (2006) 168-176.
- [184] B. Klimek, Analiza fitochemiczna roślinnych substancji leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, 2011.
- [185] E. Tripoli, M. La Guardia, S. Giammanco, D. Di Majo, M. Giammanco, Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review, *Food Chemistry* 104 (2007) 466-479.
- [186] I. Erlund, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology, *Nutrition Research* 24 (2004) 851-874.
- [187] M. Machowski, D. Kaliszewska, A. Kiss, Chromatographic methods of isolation and identification of flavonoids and saponins, *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego WUM* 4 (2010) 27-37.
- [188] M. Shoeb, M. Jaspars, S.M. MacManus, S. Celik, L. Nahar, P. Kong-Thoo-Lin, S.D. Sarker, Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae), *Journal of Natural Medicines* 61 (2007) 164-169.
- [189] W. Xiao, L. Han, B. Shi, Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*, *Separation and Purification Technology* 62 (2008) 616-620.
- [190] G. Pan, G. Yu, C. Zhu, J. Qiao, Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS), *Ultrasonics Sonochemistry* 19 (2012) 486-490.
- [191] W. Cao, S.S. Hua, L.H. Ye, J. Cao, X.Q. Pang, J.J. Xu, Trace matrix solid phase dispersion using a molecular sieve as the sorbent for the determination of flavonoids in fruit peels by ultra-performance liquid chromatography, *Food Chemistry* 190 (2016) 474-480.
- [192] J. Liu, S. Lin, Z. Wang, C. Wang, E. Wang, Y. Zhang, J. Liu, Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitrite-scavenging ability, *Food and Bioproducts Processing* 89 (2011) 333-339.
- [193] N. Wang, X. Huang, X. Wang, Y. Zhang, R. Wu, D. Shou, Pipette tip solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of flavonoids from *Epimedium herba* in rat serum and application of the technique to pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatography B* 990 (2015) 64-72.
- [194] E. de Rijke, P. Out, W.M.A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U.A.Th. Brinkman, Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A* 1112 (2006) 31-63.
- [195] I. Parejo, E. Caprai, J. Bastida, F. Viladomat, O. Jáuregui, C. Codina, Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition, *Journal of Ethnopharmacology* 94 (2004) 175-184.
- [196] L. Czerwiecki, Współczesne poglądy na rolę przeciwutleniaczy roślinnych w profilaktyce chorób cywilizacyjnych, *Roczniki PZH* 66 (2009) 201-206.
- [197] J. Balach, Super antyoksydanty czyli leki XXI wieku w naszym jedzeniu, Wydawnictwo Amber, Warszawa, 2002.
- [198] F. Le Cren, Przeciwutleniacze. Rewolucja w medycynie XXI wieku, Wydawnictwo Klub Dla Ciebie, Warszawa, 2006.

- [199] A. Wawrzyniak, M. Krotki, B. Stoparczyk, Właściwości antyoksydacyjne owoców i warzyw, *Medycyna Rodzinna* 1 (2011) 19-23.
- [200] A. Czajka, Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu, *Nowiny Lekarskie* 75 (2006) 582-586.
- [201] A. Karpińska, G. Gromadzka, Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne - znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67 (2013) 43-53.
- [202] J. Lü, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (2010) 840-860.
- [203] T.P.A. Devasagayam, J.C. Tilak, K.K. Bloor, K.S. Sane, S.S. Ghaskadbi, R.D. Lele, Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects, *Journal of the Association of Physicians of India* 52 (2004) 794-804.
- [204] G. Andrykowski, Z. Maziarz, B. Małkowski, A. Rożej, W. Tryniszewski, Antyoksydanty w ochronie radiologicznej - metody detekcji i identyfikacji wolnych rodników, *Współczesna Onkologia* 6 (2000) 267-268.
- [205] S. Ball, *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*, Wydawnictwo Medyk, Warszawa, 2001.
- [206] N.F. Wiernsperger, Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy, *Diabetes & Metabolism* 29 (2003) 579-585.
- [207] K. Rahman, Studies on free radicals, antioxidants and co-factors, *Journal of Clinical Interventions in Aging* 2 (2007) 219-236.
- [208] P.P. Singh, A. Chandra, F. Mahdi, A. Ray, P. Sharma, Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 25 (2010) 225-243.
- [209] E. Birkner, J. Zalejska-Fiolka, Z. Antoszewski, Aktywność enzymów antyoksydacyjnych i rola witamin o charakterze antyoksydacyjnym w chorobie Alzheimer, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 58 (2004) 264-269.
- [210] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, The definition and measurement of antioxidants in biological systems, *Free Radical Biology & Medicine* 18 (1995) 125-126.
- [211] B. Halliwell, Biochemistry of oxidative stress, *Biochemical Society Transactions* 35 (2007) 1147-1150.
- [212] A.I. Khlebnikov, I.A. Schepetkin, N.G. Domina, L.N. Kirpotina, M.T. Quinn, Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 1749-1770.
- [213] B. Halliwell, How to characterize a biological antioxidant, *Free Radic. Res. Commun.* 9 (1990) 1-32.
- [214] K. Król, T. Konopka, Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in the pathogenesis of periodontitis, *Dental and Medical Problems* 40 (2003) 121-128.
- [215] M. Battino, M.S. Ferreiro, I. Gallardo, H.N. Newman, P. Bullon, The antioxidant capacity of saliva, *Journal of Clinical Periodontology* 29 (2002) 189-194.
- [216] G. Klupińska, A. Mordalska, E. Walecka, J. Chojnacki, A. Szadkowski, Evaluation of oxygen metabolism parameters in people living in large city agglomeration potentially exposed to some carcinogenic environmental factors and infected with helicobacter pyroli, *Medycyna Pracy* 54 (2003) 549—553.
- [217] W. Zheng, S.Y. Wang, Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 5165-5170.
- [218] Y.S. Veliloglu, G. Mazza, L. Gao, B.D. Oomah, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 4113-4117.



- [219] M.B. Hossain, N.P. Brunton, C. Barry-Ryan, A.B. Martin-Diana, M. Wilkinson, Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants, *Rasayan Journal of Chemistry* 1 (2008) 751-756.
- [220] G.C. Yen, P.D. Duh, H.L. Tsai, Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid, *Food Chemistry* 79 (2002) 307-313.
- [221] M.H.H. Roby, M.A. Sarhan, K.A.H. Selim, K.I. Khalel, Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts, *Industrial Crops and Products* 43 (2013) 827-831.
- [222] Z. Zaborowska, K. Przygoński, A. Bilska, Antioxidative effect of thyme (*Thymus vulgaris*) in sunflower oil, *Acta Scientiarum Polonorum* 3 (2012) 283-291.
- [223] S. Agrawal, G.T. Kulkarni, V.N. Sharma, A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminalia paniculata* and *Madhuca longifolia*, *The Journal of Free Radicals and Antioxidants* 1 (2011) 62-68.
- [224] M. Carocho, I.C.F.R. Ferreira, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology* 51 (2013) 15-25.
- [225] A.V. Badarinath, K. Mallikarjuna Rao, C.M.S. Chetty, S. Ramkanth, T.V.S Rajan, K. Gnanaprakash, A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations, *International Journal of PharmTech Research* 2 (2010) 1276-1285.
- [226] H.A.G. Niederländer, T.A. van Beek, A. Bartasiute, I.I. Koleva, Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1210 (2008) 121-134.
- [227] K.F. Pirker, T.G. Reichenauer, B.A. Goodman, K. Stolze, Identification of oxidative processes during simulated mastication of uncooked foods using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Analytica Chimica Acta* 520 (2004) 69-77.
- [228] J. Zhao, J.S. Zhang, B. Yang, G.P. Lv, S.P. Li, Free radical scavenging activity and characterization of sesquiterpenoids in four species of *Curcuma* using a TLC bioautography assay and GC-MS analysis, *Molecules* 15 (2010) 7547-7557.
- [229] M. Cybul, R. Nowak, Review of the methods applied to measuring of antioxidant activity of plant extracts, *Herba Polonica* 54 (2008) 68-78.
- [230] A.R. Ndhlala, M. Moyo, J. Van Staden, Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?, *Molecules* 15 (2010) 6905-6930.
- [231] R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 4290-4302.
- [232] M.S. Gíao, M.L. Gonzalez-Sanjose, M.D. Rivero-Perez, C.I. Pereira, M.E. Pintado, F.X. Malcata, Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (2007) 2638-2647.
- [233] A. Büyükbacı, S. Nehir El, Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas, *Plant Foods for Human Nutrition* 63 (2008) 27-33.
- [234] P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26 (2004) 211-219.
- [235] V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset, Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method, *LWT - Food Science and Technology* 30 (1997) 609-615.

- [236] A.C. Guedes, H.M. Amaro, M.S. Gião, F.X. Malcata, Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteriai, *Food Chemistry* 138 (2013) 638-643.
- [237] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology & Medicine* 26 (1999) 1231-1237.
- [238] J. Rodriguez, E.C. Melo, A. Mulet, J. Bon, Optimization of the antioxidant capacity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts: Management of the convective drying process assisted by power ultrasound, *Journal of Food Engineering* 119 (2013) 793-799.
- [239] A. Baghiani, S. Boumerfeg, M. Adjadj, D. Ameni, M. Djermouni, F. Khelifi-Touhami, N. Charef, S. Khennouf, L. Arrar, Antioxidants, free radicals scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of *Ajuga reptans* L. extracts, *Free Radicals and Antioxidants* 1 (2011) 21-30.
- [240] N. Pellegrini, M. Serafini, S. Salvatore, D. Del Rio, M. Bianchi, F. Brighenti, Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, *Molecular Nutrition & Food Research* 50 (2006) 1030 - 1038.
- [241] Md. Nur Alam, N.J. Bristi, Md. Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal* 21 (2013) 143-152.
- [242] D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apak, Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement, *Talanta* 71 (2007) 1155-1165.
- [243] R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata, M. Özyürek, S.E. Çelik, B. Bektaşoğlu, K.I. Berker, D. Özyurt, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules* 12 (2007) 1496-1547.
- [244] T.P. Smina, J. Mathew, K.K. Janardhanan, T.P.A. Devasagayam, Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32 (2011) 438-446.
- [245] A. Tai, T. Sawano, F. Yazama, H. Ito, Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays, *Biochimica et Biophysica Acta* 1810 (2011) 170-177.
- [246] I.M. Choma, Bioluminescencja, czyli analiza ukierunkowana na efekt, *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania* 15 (2010) 8-14.
- [247] W. Brack, Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003) 397-407.
- [248] S.S. Teh, G.E. Morlock, Effect-directed analysis of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils by planar chromatography linked with (bio)assays and mass spectrometry, *Food Chemistry* 187 (2015) 460-468.
- [249] M.G. Weller, A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques, *Sensors* 12 (2012) 9181-9209.
- [250] W. Brack, H.J.C. Klamer, M. López de Alda, D. Barceló, Effect-Directed Analysis of Key Toxicants in European River Basins A Review, *Environmental Science and Pollution Research* 14 (2007) 30 - 38.
- [251] I.M. Choma, The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis, *LC-GC Europe* 18 (2005) 482-488.
- [252] S.F. van Vuuren, A.M. Viljoen, R.L. van Zyl, F.R. van Heerden, K. Husnu, C. Baser, The antimicrobial, antimalarial and toxicity profiles of helihumulone, leaf essential oil and extracts of *Helichrysum cymosum* (L.) D. Don subsp. *cymosum*, *South African Journal of Botany* 72 (2006) 287 - 290.
- [253] A.R. Shahverdi, F. Abdolpour, H.R. Monsef-Esfahani, H. Farsam, A TLC bioautographic assay for the detection of nitrofurantoin resistance reversal compound, *Journal of Chromatography B* 850 (2007) 528-530.

- [254] H.L. Stewart, S.A. Grinshpun, K. Willeke, S. Terzieva, V. Ulevicius, J. Donnelly, Effect of impact stress on microbials recovery on an agar surface, *Applied and Environmental Microbiology* 61 (1995) 1232-1239.
- [255] V. Molnar, F. Billes, E. Tyihak, P.G. Ott, Bioautographic detection of antimicrobial compounds in the edible Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), *Journal of Planar Chromatography* 21 (2008) 423-426.
- [256] P.N. Okusa, C. Stevigny, M. Devleeschouwer, P. Duez, Optimization of the culture medium used for direct TLC-bioautography. Application to the detection of antimicrobial compounds from *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae), *Journal of planar chromatography* 23 (2010) 245-249.
- [257] D. Tasdemir, A. A. Dönmez, I. Çalis, P. Rüedi, Evaluation of biological activity of Turkish plants. Rapid screening for the antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibitory potential by TLC bioautographic methods, *Pharmaceutical Biology* 42 (2004) 374-383.
- [258] I.M. Choma, C. Kowalski, R. Lodkowski, A. Burmańczuk, I. Komaniecka, TLC-DB as an Alternative to the HPLC Method in the Determination of Cefacetril Residues in Cow's Milk, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31 (2008) 1903-1912.
- [259] K. Ueta, M. Nishioka, Y. Yabuta, F. Watanabe, TLC-bioautography analysis of vitamin B12 compound from the short-necked clam (*Ruditapes philippinarum*) extract used as a flavoring, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 33 (2010) 972-979.
- [260] R.R. Goodall, A.A. Levi, A Microchromatographic Method for the Detection and Approximate Determination of the Different Penicillins in a Mixture, *Nature* 158 (1946) 675-676.
- [261] I.M. Choma, E.M. Grzelak, Bioautography detection in thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 2684-2691.
- [262] A. Marston, Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 2676-2683.
- [263] L. Komsta, M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, *Thin Layer Chromatography in Drug Analysis*, CRC Press, 2013.
- [264] E. Meyers, D. Smith, Bioautography of antibiotic spread-layer chromatograms, *Journal of Chromatography* 14 (1964) 129-132.
- [265] N. Narasimhachari, S. Ramachandran, A simple bioautographic technique for identifying biologically active material on thin-layer chromatograms, *Journal of Chromatography* 27 (1967) 494
- [266] L. Williams, O. Bergersen, Towards an integrated platform for combinatorial library synthesis and screening, *Journal of Planar Chromatography* 14 (2001) 318-321.
- [267] L. Zheng, H. Chen, X. Han, W. Lin, X. Yan, Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleве*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21 (2005) 201-206.
- [268] E.M. Grzelak, W. Jesionek, B. Majer-Dziedzic, I.M. Choma, Applications of novel direct bioautography tests for analysis of antimicrobials: A review, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* 96 (2013) 1167-1174.
- [269] Á.M. Móricz, G. Horváth, P. Molnár, B. Kocsis, A. Böszörményi, É. Lemberkovics, P.G. Ott, Investigation of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oil by Use of the BioArena System, *Journal of Planar Chromatography* 23 (2010) 406-410.
- [270] I.M. Choma, A. Choma, I. Komaniecka, K. Pilorz, K. Staszczuk, Semiquantitative estimation of enrofloxacin and ciprofloxacin by thin-layer chromatography - Direct bioautography, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 27 (2004) 2071-2085.
- [271] J.K. Pauncz, I. Harsányi, Aminoglycoside antibiotics: thin-layer chromatography, bioautographic detection and quantitative assay, *Journal of Chromatography A* 195 (1980) 251-256.

- [272] A. Ramirez, R. Gutiérrez, G. Diaz, C. González, N. Pérez, S. Vega, M. Noa, High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk, *Journal of Chromatography B* 784 (2003) 315-322.
- [273] Ch. Weins, H. Jork, Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography A* 750 (1996) 403-407.
- [274] G. Eberz, H.G. Rast, K. Burger, W. Kreiss, C. Weisemann, Bioactivity screening by chromatography-bioluminescence coupling, *Chromatography* 43 (1996) 5-9.
- [275] Á.M. Móricz, E. Tyihák, P.G. Ott, Usefulness of Transgenic Luminescent Bacteria in Direct Bioautographic Investigation of Chamomile Extracts, *Journal of Planar Chromatography* 23 (2010) 180-183.
- [276] V. Baumgartner, W. Schwack, Enhanced quantitative evaluation of the HPTLC-bioluminescence detection *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 33 (2010) 980-995.
- [277] A. Marston, M. Maillard, K. Hostettmann, The role of TLC in the investigations of medicinal plants of Africa, South America and other tropical regions, *GIT Lab. J.* 1 (1997) 36-39.
- [278] J. Augustyniak, K. Sawicki, M. Skrzypczak, L. Kapka-Skrzypczak, Application of oncolytic viruses in anti-cancer therapy, *Problemy Higieny i Epidemiologii* 93 (2012) 654-662.
- [279] I. Chojnicka, W. Janiszowska, Przeciwnowotworowe działanie roślinnych triterpenoidów: kwasu oleanolowego i ursolowego oraz ich pochodnych, *Kosmos - Problemy Nauk Biologicznych* 56 (2007) 335-341.
- [280] B. Kusznierevich, A. Piasek, J. Lewandowska, A. Śmiechowska, A. Bartoszek, Właściwości przeciwnowotworowe kapusty białej, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 55 (2007) 20-34.
- [281] J. Sieluk, Naturalne substancje przeciwnowotworowe, *Gazeta Farmaceutyczna* 2 (2010) 30-31.
- [282] E. Hawk, R. Lubet, P. Limburg, Chemoprevention in Hereditary Colorectal Cancer Syndromes, *Cancer* 86 (1999) 2551-2563.
- [283] R. Doll, Epidemiological evidence of the effects of behavior and the environment on the risk of human cancer, *Recent Results in Cancer Research* 154 (1998) 3-21.
- [284] S.L. Taylor, *Advances In Food and Nutrition Research*, Elsevier Academic Press 49 (2005) 14-20.
- [285] K.K. Stewart, Diet and cancer : some thoughts for future research, *Journal of Food Composition and Analysis* 10 (1997) 283-284.
- [286] M. Wiczorek, S. Sobiak, R.K. Meissner, Development of research on utilization of plant-derived substances in tumor treatment, *Nowiny Lekarskie* 75 (2006) 407-413.
- [287] L. Fremont, Biological effects of resveratrol, *Life Sciences* 66 (2000) 663-673.
- [288] J. German, R. Walzem, The health benefits of wine, *Annual Review of Nutrition* 20 (2000) 561-593.
- [289] J. Zalega, D. Szostak-Węgierek, Nutrition in cancer prevention. Part III. Diets of anticancer properties, *Problemy Higieny i Epidemiologii* 94 (2013) 59-70.
- [290] M. Suganoma, S. Okabe, N. Sueoka , Green tea and cancer chemoprevention, *Mutation Research* 428 (1999) 339-344.
- [291] J. Całka, A. Zasadowski, J. Juranek, Niektóre aspekty leczniczego działania zielonej herbaty, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 41 (2008) 5-14.
- [292] M. Donejko, M. Niczyporuk, E. Galicka, A. Przyłipiak, Anti-cancer properties epigallocatechin-gallate contained in green tea, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67 (2012) 26-34.
- [293] P. Greenwald, C.K. Clifford, J.A. Milner, Diet and cancer prevention, *European Journal of Cancer* 37 (2001) 948-965.

- [294] J. Peterson, J. Dwyer, Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity, *Nutrition Research* 18 (1998) 1995-2018.
- [295] R. Dixon, Phytoestrogens, *Annual Review of Plant Biology* 55 (2004) 225-261.
- [296] E. Kałędkiewicz, E. Lange, Znaczenie wybranych związków pochodzenia roślinnego w diecie zapobiegającej chorobom nowotworowym *Postępy Fitoterapii* 1 (2013) 42-47.
- [297] J. Krzysztoń-Russjan, I. Książek, E. Anuszevska, Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków, *Farmacja Polska* 65 (2009) 395-402.
- [298] Q. Niu, C. Zhao, Z. Jing, An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity, *Journal of Immunological Methods* 251 (2001) 11-19.
- [299] S.K. Bopp, T. Lettieri, Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line, *BMC Pharmacology* 8 (2008) 8.
- [300] Ł. Dorobek, P. Szcześniak, P. Thor, D. Orszulak-Michalak, Aktualne kierunki poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych, *Geriatrics* 2 (2008) 37-46.
- [301] K. Chiba, K. Kawakami, K. Tohyama, Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells, *Toxicology in vitro* 12 (1998) 251-258.
- [302] G. Fotakis, J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters* 160 (2006) 171-177.
- [303] S.P. Crouch, R. Kozłowski, K.J. Slater, J. Fletcher, The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity, *Journal of Immunological Methods* 160 (1993) 81-88.
- [304] M.M. Boobar, F. Goodarzi, Cytotoxicity and the levels of oxidative stress parameters in WI38 cells following 2 macrocyclic crown ethers treatment, *Clinica Chimica Acta* 364 (2006) 321-327.
- [305] A. Jaszczyżyn, K. Gąsiorowski, Limitations of the MTT assay in cell viability testing, *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 17 (2008) 525-529.
- [306] G. Malich, B. Markovic, C. Winder, The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines, *Toxicology* 124 (1997) 179-192.
- [307] R.S. Gieni, Y. Li, K.T. HayGlass, Comparison of [3H]thymidine incorporation with MTT- and MTS-based bioassays for human and murine IL-2 and IL-4 analysis. Tetrazolium assays provide markedly enhanced sensitivity, *Journal of Immunological Methods* 187 (1995) 85-93.
- [308] J. Jacobsen, M. Pedersen, M.R. Rassing, TR146 cells as a model for human buccal epithelium: II. Optimisation and use of a cellular sensitivity MTS/PMS assay, *International Journal of Pharmaceutics* 141 (1996) 217-225.
- [309] T.M. Buttke, J.A. McCubrey, T.C. Owen, Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines, *Journal of Immunological Methods* 157 (1993) 233-240.
- [310] K. Berg, L. Zhai, M. Chen, A. Kharazmi, T.C. Owen, The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes, *Parasitology Research* 80 (1994) 235-239.
- [311] *Farmakopea Polska VI* (2002) Polish Pharmaceutical Society, Warszawa, Polska.
- [312] M. Sajewicz, D. Staszek, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Comparison of TLC and HPLC Fingerprints of Phenolic Acids and Flavonoids Fractions Derived from Selected Sage (*Salvia*) Species, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 35 (2012) 1388-1403.
- [313] Z. Jerzmanowska, *Plant Material. The Isolation Methods* (in Polish), PWN, Warszawa, 1967.

- [314] L. Świątek, The Iridoid Phenolic Acids and Glycosides in Certain Polish Medicinal Herbs from the *Plantago* Genus. *Herba Polonica* 23 (1977) 201-210.
- [315] R. K. Ibrahim, G. H. Towers, The Identification by Chromatography of Plant Phenolic Acids, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 87 (1960) 125-127.
- [316] L. Świątek, E. Dombrowicz, Phenolic Acids in the Bitter Raw Materials. Part I. Analysis of the *Artemisia absinthium* Herb and the *Gentian* root, *Farmacja Polska* 40 (1984) 729-732.
- [317] H. Schmidlein, K. Hermann, Quantitative Analysis for Phenolic Acids by Thin Layer Chromatography, *Journal of Chromatography* 115 (1975) 123-128.
- [318] H. Wagner, S. Bladt, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
- [319] R.H. Myers, D.C. Montgomery, C.M. Anderson-Cook, *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designated Experiments*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2009.
- [320] P.H.C. Eilers, Parametric Time Warping, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 404-411.
- [321] N.-P.V. Nielsen, J.M. Carstensen, J. Smedsgaard, Aligning on single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping, *Journal of Chromatography A* 805 (1998) 17-35.
- [322] M. Wójcik-Kosior, A. Oniszcuk, In *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska, Eds.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, Floryda, 2008.
- [323] E. Rijke de, P. Out, W.M.A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U.A.Th. Brinkman, Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112 (2006) 31-63.
- [324] Ł. Cieśla, D. Staszek, M. Hajnos; T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, Development of Chromatographic and Free Radical Scavenging Activity Fingerprints by Thin-Layer Chromatography for Selected *Salvia* Species. *Phytochemical Analysis* 22 (2011) 59-65.
- [325] D.F. Thekkudan, S.C. Rutan, In *Comprehensive Chemometrics*, Vol. 2, S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds), Elsevier, Amsterdam, Holandia, 2009.
- [326] J. Trygg, J. Gabrielsson, T. Lundstedt, In *Comprehensive Chemometrics*, Vol. 2, S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds), Elsevier, Amsterdam, Holandia, 2009.
- [327] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Principal Component Analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2 (1987) 37-52.
- [328] M. Daszykowski, B. Walczak, D.L. Massart, Projection methods in chemistry, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 65 (2003) 97-112.
- [329] P.B. Harrington, N.E. Vieira, P. Chen, J. Espinoza, J.K. Nien, R. Romero, A. Yergey, Proteomic analysis of amniotic fluids using analysis of variance-principal component analysis and fuzzy rule-building expert systems applied to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 82 (2006) 283-293.
- [330] J.J. Jansen, H.C.J. Hoefsloot, J. Van der Geert, M.E. Timmerman, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, ASCA: analysis of multivariate data obtained from an experimental design, *Journal of Chemometrics* 19 (2005) 469-481.
- [331] A.K. Smilde, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, The geometry of ASCA, *Journal of Chemometrics* 22 (2008) 464-471.
- [332] I. Stanimirova, K. Michalik, Z. Drzazga, H. Trzeciak, P.D. Wentzell, B. Walczak, Interpretation of analysis of variance models using principal component analysis to assess the effect of a maternal anticancer treatment on the mineralization of rat bones, *Analytica Chimica Acta* 689 (2011) 1-7.

- [333] I. Stanimirova, M. Kazura, D. de Beer, E. Joubert, A.E. Schulze, T. Beelders, A. de Villiers, B. Walczak, High-dimensional nested analysis of variance to assess the effect of production season, quality grade and steam pasteurization on the phenolic composition of fermented rooibos herbal tea, *Talanta* 115 (2013) 590-599.
- [334] M.J. Anderson, C.J.F. Ter Braak, Permutation tests for multi-factorial analysis of variance, *Journal of Statistical Computation and Simulation* 73 (2003) 85-113.
- [335] M. Marino, C. Bersani, G. Comi, Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method, *Journal of Food Protection* 62 (1999) 1017-1023.
- [336] S.S. Salih, The antimicrobial activity of ethanol extract of *Thymus vulgaris* on *Salmonella typhi* in rabbits, *British Journal of Pharmacology and Toxicology* 3 (2012) 147-150.
- [337] F.M. Awah, N.N. Offor, A.C. Ndunaka, F.U. Okafor, C.O. Enyabine, Free radical scavenging activities and phenolic contents of the spices, *Thymus vulgaris* (thyme), *Helichrysum italicum* (curry leaf) and *Laurus nobilis* (bay leaf) extracts, *Journal of Pharmacy Research* 5 (2012) 2994-2998.
- [338] J. Polak, M. Bartoszek, The study of antioxidant capacity of varieties of nalewka, a traditional Polish fruit liqueur, using EPR, NMR and UV-vis spectroscopy, *Journal of Food Composition and Analysis* 40 (2015) 114-119.
- [339] J. Deng, W. Cheng, G. Yang, A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay, *Food Chemistry* 125 (2011) 1430-1435.
- [340] T. Delgado, P. Marinero, M.C. Asensio-S.-Manzanera, C. Asensio, B. Herrero, J.A. Pereira, E. Ramalhosa, Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition, *Journal of Food Science and Technology* 57 (2014) 412-418.
- [341] O. Sagdic, G. Ozkan, A. Aksoy, H. Yetim, H. Bioactivities of essential oil and extract of *Thymus argaeus*, Turkish endemic wild thyme, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (2009) 791-795.
- [342] F. Pourmohamad, S. Enteshari, R. Sariri, R. Total phenolic content and antioxidant activity of the methanolic extracts of three *Thymus* cultivars grown in Iran, *Pharmacologyonline* 1 (2011) 851-860.
- [343] M.S. Cosio, S. Buratti, S. Mannino, S. Benedetti, Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family, *Food Chemistry* 97 (2006) 725-731.
- [344] R. Amarowicz, Z. Żegarska, R. Rafałowski, R.B. Pegg, M. Karamać, A. Kosińska, Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram, *European Journal of Lipid Science and Technology* 111 (2009) 1111-1117.
- [345] F. El Babili, M.E.L. Babili, J.-P. Souchard, C. Chatelain, Culinary, Decoctions: Spectrophotometric Determination of Various Polyphenols Coupled with their Antioxidant Activities, *Pharmaceutical Crops* 4 (2013) 15-20.

## MARKER FINGERPRINTS ORIGINATING FROM TLC AND HPLC FOR SELECTED PLANTS FROM THE LAMIACEAE FAMILY

Dorota Staszek,<sup>1</sup> Marta Orłowska,<sup>1</sup> Monika Waksmundzka-Hajnos,<sup>2</sup>  
Mieczysław Sajewicz,<sup>1</sup> and Teresa Kowalska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland

<sup>2</sup>Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

□ Phytochemical analysis of plant extracts is an increasingly important field of analytical chemistry, and for several reasons. In the case of medicinal plants usually traded in a dried and crumbled form, phytochemical analysis serves the purpose of authentication of herbal material and protects patients against adulteration. In botanical sciences, phytochemical analysis is employed for the development of plant systematics known as chemotaxonomy. Due to an unknown composition of plant extracts and an inherent difficulty in selecting proper phytochemical standards, a phytochemical approach has been developed known as fingerprinting. This approach circumvents tedious identification of individual constituents of plant extracts and instead, focuses on a comparison of the whole chromatograms in order to trace similarities and dissimilarities among the plants. In this study, we present the results of a comparison of six plant species belonging to three genera of the Lamiaceae family (i.e., *Salvia*, *Thymus*, and *Dracocephalum*). This comparison was purposely carried out for the Lamiaceae plants, as many of them have been recognized for their curative properties by traditional medicines in many regions of the world (and in the first instance, in the Mediterranean zone). As phenolic acids and flavonoids play crucial role in many curative processes, in our study we employed TLC and HPLC to fingerprint the selectively extracted six phenolics fractions for the six plants belonging to the three aforementioned genera. The obtained results point out to the flavonoid aglycons (FA) fraction which most distinctly discriminates among the individual plant species, while the remaining five fractions are the carriers of less vital information. Finally, an assumption was made that the chromatograms derived by means of TLC and HPLC for the fraction of flavonoid aglycons can be considered as marker fingerprints, able to distinguish among closely related plants belonging to different genera of the Lamiaceae family.

**Keywords** *Dracocephalum* genus, flavonoid aglycons, Lamiaceae family, marker fingerprints, *Salvia* genus, *Thymus* genus

Address correspondence to Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006, Katowice, Poland. E-mail: teresa.kowalska@us.edu.pl



## INTRODUCTION

The *Lamiaceae* family consists of ca. 250 genera and more than 3200 species worldwide, which are mostly perennial or annual herbs and shrubs. They are rather easily recognizable by having square stems and opposite or whorled leaves. Flowers of *Lamiaceae* are bilaterally symmetrical, have five united sepals and five united petals which are usually arranged so as to form an upper and often a lower lip. All these parts are attached at the base of the ovary. The fruit has four lobes, each forming single-seeded nutlet. Many of the species are aromatic, which makes them even better recognizable. *Lamiaceae* (formerly known as *Labiatae*) attract a lot of interest, as many members of this family possess considerable utilitarian properties. From this family originate many herbs used for cooking and in perfumery (just to mention a few of them such, as rosemary, French lavender, thyme, marjoram, sage, and garden mints). The *Lamiaceae* plants characteristically bear essential oils retrieved from their crushed foliage. Despite their identifiable qualities, they are a family of great diversity and variety, recognized and appreciated as a source of phenolic compounds of high biological activity.

Phenolic compounds, that is, flavonoids and phenolic acids, which are the main constituents of plants from the *Lamiaceae* family, have proven multidirectional biological activity and many of them act in prevention of many disorders.<sup>[1]</sup> Spices and drugs from the *Lamiaceae* family are a well-known source of antioxidants, and particularly polyphenols.<sup>[2]</sup> A total of polyphenols distributed in the four major categories (hydroxycinnamic acid derivatives, hydroxybenzoic acid derivatives, flavonoids, and phenolic terpenes, mainly in the form of such derivatives, as esters and glycosides) have often been studied.<sup>[2]</sup> Investigations carried out on phenolic compounds have shown a wide range of biological activities other than mere antioxidant properties only (such, as anti-inflammatory, hepatoprotective, antithrombotic, vasodilating, and anticarcinogenic activity).

Common thyme (*Thymus vulgaris* L.) is indigenous to the Mediterranean zone and the neighboring countries, that is, North Africa and several parts of Asia. Its beneficial properties include antispasmodic, expectorant, antibacterial, antifungal, antiviral, antiprotozoal, and antioxidant properties.<sup>[1]</sup> In medicine, wild thyme or serpolet (*Thymus serpyllum* L.) has the same properties as common thyme, but to an inferior degree. It is aromatic, antiseptic, stimulant, antispasmodic, diuretic, and emmenagogue. The infusion prepared of wild thyme is used for chest maladies and for weak digestion, being a good remedy for flatulence, and the favorable results have been obtained in convulsive coughs, especially in whooping cough, catarrh, and sore throat.<sup>[3]</sup>

Dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) is a perennial herb which has been traditionally used due to its precious culinary properties and for the

treatment of stomach and liver disorders, headache, and congestion. Dragonhead is also used as a cardiotonic agent in the folk medicine of Iran. An in vitro evaluation of dragonhead's total extract showed an anti-*Helicobacter pylori* activity. Other sources report such pharmacological properties of this plant as sedative, carminative, skin anti-inflammatory (as a topical preparation), spasmolytic, anti-microbial, and fungicidal.<sup>[4]</sup> Earlier phytochemical studies on dragonhead have resulted in identification of the phenolics (rosmarinic and caffeic acid), iridoids, sesquiterpenoids, flavonoids, triterpenoids, and steroids.<sup>[5]</sup>

Sage (*Salvia*) species also make an important group of plants which are used for food flavoring, as pharmaceuticals, and in perfumery. They have been reportedly used in folk medicine for wound healing and in alleviating stomach, liver, and rheumatic pains. Sage acts as an antiphlogistic, stomachic, antiseptic, antiasthmatic, and astringent drug, and it is also used as a spice. However, the majority of the wild growing *Salvia* species have not yet been fully evaluated from the phytochemical point.<sup>[6]</sup>

The aim of this study was to compare fingerprints of the phenolics fractions selectively derived from *Salvia staminea* L. and *Salvia triloba* L., *Thymus vulgaris* L. and *Thymus serpyllum* L., and *Dracocephalum moldavica* L. (white and blue blooming) with use of thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (with diode array and evaporative light scattering detection, HPLC/DAD and HPLC/ELSD). The main aim of this comparison was to find similarities in composition of particular phenolics fractions derived from the aforementioned *Lamiaceae* plants and to establish chemotaxonomic markers for them in form of the whole chromatographic profiles.

## EXPERIMENTAL

### Materials and Reagents

In Table 1, we listed six plant species belonging to the three different plant genera (*Salvia*, *Thymus*, and *Dracocephalum*). Two plants from

**TABLE 1** Investigated Plant Genera, Species, and Varieties, and the Respective Harvesting Years

No.	Genus	Species / Variety	Harvesting Year
1	<i>Salvia</i>	<i>Salvia triloba</i>	2009
2	<i>Salvia</i>	<i>Salvia staminea</i>	2009
3	<i>Dracocephalum</i>	<i>Dracocephalum moldavica</i> (variety with white flowers)	2011
4	<i>Dracocephalum</i>	<i>Dracocephalum moldavica</i> (variety with blue flowers)	2011
5	<i>Thymus</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	2011
6	<i>Thymus</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	2011

*Dracocephalum* genus (with white and blue flowers) represent different varieties of the same species. All investigated plants belong to the *Lamiaceae* family and they originate from the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland. This plant material was dried for 40 hr in an oven with a forced air flow at 30 to 40°C. The obtained dry material was stored in a refrigerator until the commencement of the analysis.

All solvents and other reagents used in our experiment were of the analytical purity grade (POCH, Gliwice, Poland). Water was double distilled and de-ionized in the laboratory conditions by means of the Elix Advantage model Millipore system (Molsheim, France)

### Selective Multi-Step Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids From Herbal Material

Selective multi-step extraction of phenolic acids and flavonoids from the plants belonging to the three *Lamiaceae* genera was performed according to the complex procedure described and supplemented with an adequate workflow chart in paper.<sup>[7]</sup> The detailed protocol of this procedure was elaborated based on the information derived from the literature.<sup>[8–12]</sup> As a result of this multi-step extraction, three fractions of phenolic acids and three fractions of flavonoids were obtained, as listed with relevant acronyms in Table 2. For the sake of convenience, from now on these acronyms will be used throughout this study.

### Thin Layer Chromatographic Fingerprinting of Individual Fractions of Phenolic Acids and Flavonoids

The commercial Si 60 F<sub>254</sub> coated glass plates (10 cm × 20 cm; Merck, Darmstadt, Germany; cat. no. 1.05729) were used in the thin-layer

**TABLE 2** Six Fractions of Phenolic Compounds, Their Acronyms, and Brief Characteristics

Fraction	Acronym	Characteristics
Free phenolic acids	FPA	Free form in plant material
Bonded phenolic acids (1)	APA	Bonded form in plant material, liberated through acidic hydrolysis
Bonded phenolic acids (2)	BPA	Bonded form in plant material, liberated through basic hydrolysis
Flavonoid aglycons	FA	Free form in plant material
Flavonoid glycosides (1)	FGO	Low-polar flavonoid glycosides (extracted with ethyl acetate)
Flavonoid glycosides (2)	FGB	Polar flavonoid glycosides, (extracted with <i>n</i> -butanol)

chromatographic experiment. Before use, the plates were activated at 110°C for 15 min. The obtained plant extracts were applied to the chromatographic plates in the 10- $\mu$ L aliquots (**FPA**, **APA**, **BPA**, **FA**, **FGB**, and **FBO**) as the 1-cm long bands with use of an AS 30 model auto sampler (Desaga, Heidelberg, Germany). All planar chromatograms were developed in the sandwich DS chambers (Chromdes, Lublin, Poland), previously saturated with mobile phase vapor for 15 min. The chromatograms were developed 15 cm high and then dried at ambient temperature (ca. 22°C) for 3 hr. After drying, each chromatogram was photographed with a digital camera at the wavelength  $\lambda = 366$  nm in the TLC dark box (Camag, Muttensz, Switzerland), to provide the video images of the respective chromatograms. Then, the chromatograms were sprayed with the 1% aluminum chloride solution in methanol (in order to obtain a better visualizing effect<sup>[13]</sup>) and again photographed.

For the development of the three phenolic acids fractions (**FPA**, **APA**, and **BPA**), benzene + ethyl acetate + formic acid, 6:3:1 (*v/v*) was used as mobile phase.<sup>[13]</sup> For the development of the flavonoid aglycons fraction (**FA**), toluene + ethyl acetate + formic acid, 12:6:1 (*v/v*) was applied.<sup>[14]</sup> For the development of the two flavonoid glycosides fractions (**FGB** and **FBO**), ethyl acetate + water + formic acid + acetic acid, 100:26:11:11 (*v/v*) was used as mobile phase.<sup>[15]</sup> In order to reliably evaluate the  $R_f$  values of the separated chromatographic bands, each thin-layer chromatographic separation was performed in triplicate and the obtained numerical values were averaged.

#### High Performance Liquid Chromatographic Fingerprinting of Individual Fractions of Phenolic Acids and Flavonoids

The HPLC analysis was carried out with use of a Varian 920-LC model liquid chromatograph (Harbor City, CA, USA) equipped with a Varian 900-LC model autosampler, a gradient pump, a Varian 330 model DAD, a Varian 380-LC model ELSD, and the Galaxie software for data acquisition and processing. The analyses were carried out for the 20- $\mu$ L phenolics extracts samples in the gradient mode using a Pursuit C18 (5  $\mu$ m particle size) column (250 mm  $\times$  4.6 mm id; Varian; cat. no. 1215-9307). Acetonitrile (A) and water with a 1% (*v/v*) amount of glacial acetic acid (B) were used in the following A+B (*v/v*) gradient program: from 0 to 7 min, 20+80; from 8 to 13 min, 40+60; from 14 to 19 min, 60+40; from 20 to 36 min, 100+0; and from 37 to 40 min, 20+80. The mobile phase flow rate was 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The chromatograms were recorded with use of DAD at the wavelength  $\lambda = 254$  nm and with use of ELSD.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Thin Layer Chromatographic Fingerprinting of Individual Fractions of Phenolic Acids and Flavonoids

For the purpose of this study, we selected six plants belonging to the three genera (*Salvia*, *Thymus*, and *Dracocephalus*) of the *Lamiaceae* family. It was an ultimate goal to build chromatographic fingerprints, which might differentiate among individual plants which are botanically closely related. To this effect, we focused on phenolic compounds, in natural medicine well recognized for their high curative potential and with use of selective extraction,<sup>[7]</sup> we derived from each plant six phenolics fractions (**FPA**, **APA**, **BPA**, **FA**, **FGO**, and **FGB**), as listed in Table 2. Each extract underwent the thin-layer chromatographic separation and the obtained video images of the chromatograms have an importance of the respective fingerprints. Finally, we compared the sets of the chromatograms valid for each extracted fraction.

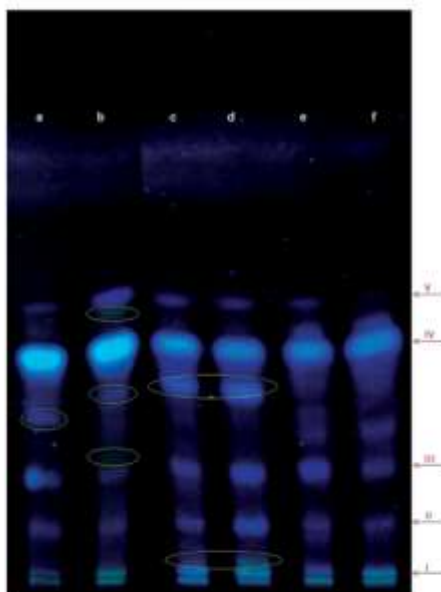


**FIGURE 1** The comparison of the video images of the thin-layer chromatograms of the flavonoid aglycons fraction (FA) derived by the selective multi-step extraction from (a) *S. staminea*, (b) *S. triloba*, (c) *D. moldavica* (white flowers), (d) *D. moldavica* (blue flowers), (e) *T. vulgaris*, and (f) *T. serpyllum*. (Color figure available online.)

Chromatograms valid for the fraction of flavonoid aglycons (**FA**) proved unique in this sense that they differentiate among the six plants considered in the best possible way (see Figure 1). Namely, from this fraction no chromatographic band appears in more than one chromatogram, so that each chromatogram is characteristic exclusively for a given plant. Due to that, the chromatograms of the **FA** fraction can be considered as marker fingerprints. No other selectively extracted fraction of phenolic compounds gives as clear a response, as **FA**.

For the sake of comparison, let us present the fingerprints for two other selectively extracted fractions of phenolics (**BPA** and **FGB**), which also exhibit certain identification valor, although far less accurately differentiate among the six *Lamiaceae* plants of interest than **FA**.

One fraction is **BPA** and the chromatograms valid for this fraction show five bands (I–V) which appear on the chromatograms of all investigated plants (Figure 2). These five bands can be considered as chemotaxonomic markers for the *Lamiaceae* family. The least intense band I ( $R_f = 0.03 \pm 0.01$ )

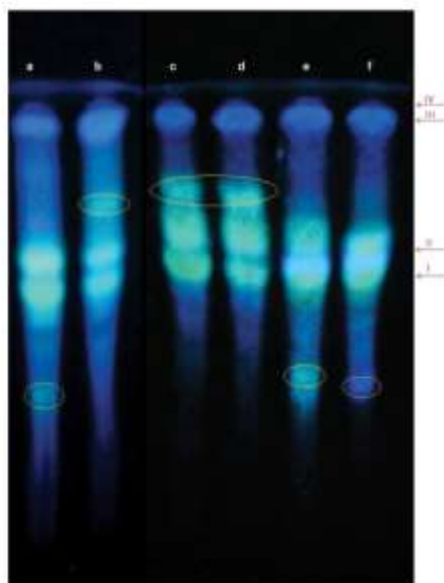


**FIGURE 2** The comparison of the video images of the thin-layer chromatograms of the phenolic acids fraction liberated through basic hydrolysis (BPA) derived by the selective multi-step extraction from (a) *S. staminea*, (b) *S. triloba*, (c) *D. moldavica* (white flowers), (d) *D. moldavica* (blue flowers), (e) *T. vulgaris*, and (f) *T. serpyllum*. Bands characteristic for individual plant species are marked with a single ellipsis and those characteristic for both plants from a given genus are marked with a double ellipsis. (Color figure available online.)



appears for *S. triloba*, and the most intense bands come from two varieties of *D. moldavica*. The most intense band II ( $R_F = 0.10 \pm 0.01$ ) appears for both *D. moldavica* varieties, while for the remaining four plants the intensity of band II is comparable yet lower. Band III ( $R_F = 0.25 \pm 0.02$ ) is the most intense in the case of the two *D. moldavica* varieties, and the least intense for *S. staminea*. The most intense band IV ( $R_F = 0.51 \pm 0.02$ ) can be seen for the two *Salvia* species, while with the remaining four plants the intensities are comparable yet lower. The most intense band V ( $R_F = 0.61 \pm 0.02$ ) is observed for *S. staminea*, and the least intense one for *T. vulgaris*.

The last set of the chromatograms compared in this study are those of **FGB** (Figure 3). In this case, four bands (I–IV) appear on the chromatograms of all investigated plants, which can also be considered as their chemotaxonomic markers. Bands I ( $R_F = 0.61 \pm 0.02$ ) and II ( $R_F = 0.68 \pm 0.02$ ) of the highest intensity characterize the chromatograms of *S. triloba* and *T. serpyllum*, respectively, while the four remaining plants demonstrate comparable yet lower intensities of these bands. With band III ( $R_F = 0.93 \pm 0.02$ ), the highest intensity characterizes *S. staminea* and the lowest one is inherent



**FIGURE 3** The comparison of the video images of the thin-layer chromatograms of the polar flavonoid glycosides fraction (FGB) derived by the selective multi-step extraction from (a) *S. staminea*, (b) *S. triloba*, (c) *D. moldavica* (white flowers), (d) *D. moldavica* (blue flowers), (e) *T. vulgaris*, and (f) *T. serpyllum*. Bands characteristic for individual plant species are marked with a single ellipsis and those characteristic for both plants from a given genus are marked with a double ellipsis. (Color figure available online.)

of *D. moldavica* with white flowers. Band IV ( $R_f = 0.97 \pm 0.02$ ) of the highest intensity characterizes *S. triloba*, while the remaining five plants demonstrate comparable yet lower intensities of this band. Moreover, on the chromatograms of *S. triloba*, *S. staminea*, *T. vulgaris*, and *T. serpyllum* certain bands are observed (marked with single ellipses), which were not found on the chromatograms of the two *D. moldavica* varieties. These bands can be regarded as chemotaxonomic advices. Besides, an additional chromatographic band at  $R_f = 0.77 \pm 0.02$  is present on the chromatograms of the two *D. moldavica* varieties (marked with double ellipsis), which is absent from the other chromatograms. Two species, *T. vulgaris* and *T. serpyllum*, characterize with an overall greatest number and highest intensity of the separated chromatographic bands.

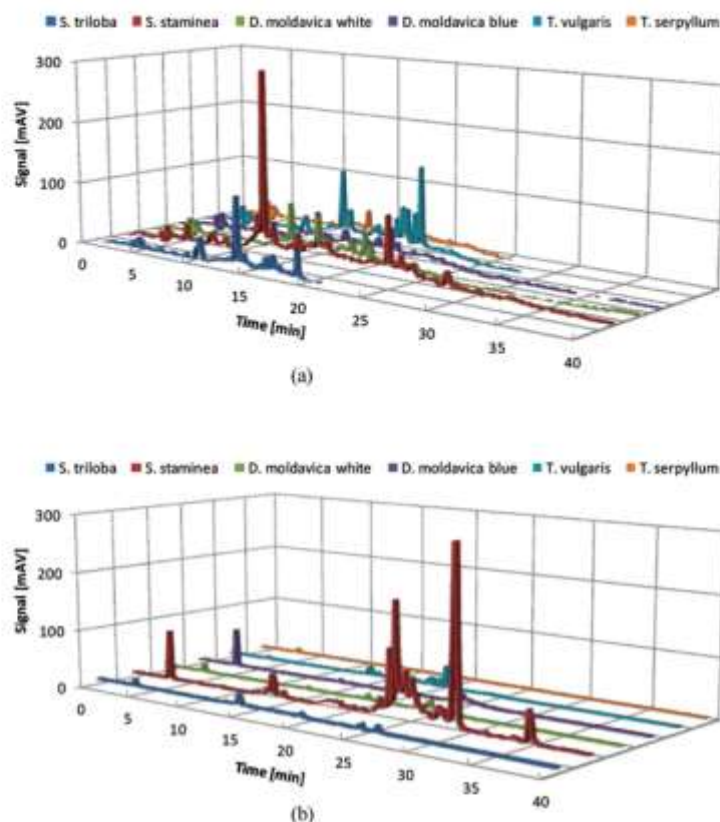
Finally, one general remark has to be made that both varieties of *D. moldavica* furnish almost identical fingerprints, no matter which extract is taken into the consideration. The only exception is the FA fraction, where minor differences between the two plant varieties are still perceptible. Hence, a conclusion can be drawn that in spite of the selective extraction and an adequate fractionation of the phenolics group, two varieties of one and the same plant species are too closely related to distinguish between them with use of the thin-layer chromatographic fingerprints.

#### High Performance Liquid Chromatographic Fingerprinting of Individual Fractions of Phenolic Acids and Flavonoids

In Figure 4, we show the chromatograms recorded by means of two detectors, DAD and ELSD, and valid for the fraction of flavonoid aglycons (FA) selectively extracted from the six different plants belonging to the three genera of *Lamiaceae* (Table 1). Additional characteristics of the chromatograms obtained by means of HPLC are provided in Tables 3 and 4.

On the chromatograms recorded by means of DAD and valid for the fraction of FA (Figure 4a), one peak at the retention time  $t_R = 13.85$  min is common for all the investigated plant species. For the plants from the *Salvia* genus, this peak shows the highest respective surface areas, which are  $77.1 \text{ mAV} \times \text{min}$  for *S. staminea* and  $31.7 \text{ mAV} \times \text{min}$  for *S. triloba*; (Table 3). For the remaining four plants from the *Dracocephalum* and *Thymus* genera, the respective surface areas are lower. The same can be said about the percentage area contribution of this peak to the total chromatograms. In the case of *S. staminea* and *S. triloba*, these percentage contributions equal to 26.5 and 19.8%, respectively (Table 3). With the remaining four plants, the analogical contributions are lower. Similar assessment of the chromatograms recorded by means of ELSD and valid for FA (Figure 4b) reveals no common chromatographic peaks for the six investigated plant species.





**FIGURE 4** The comparison of the HPLC chromatograms of the flavonoid aglycons fraction (FA) for the six investigated plant species registered with use of (a) DAD (at the wavelength  $\lambda = 254$  nm), and (b) ELSD. (Color figure available online.)

Further assessment of the chromatograms recorded by means of DAD and ELSD and valid for **FA** is summarized in Table 4. It comes out that using DAD, three peaks are recorded at the retention times ( $t_R$ ) equal to 16.38, 20.48, and 24.80 min, which are characteristic for certain groups of plants (or for individual plant). Peak at  $t_R = 16.38$  min is present on the chromatograms of the **FA** extracts from *D. moldavica* with white and blue flowers. Peak at  $t_R = 20.48$  min is present on the chromatograms of the **FA** extracts of the two *D. moldavica* varieties and *T. vulgaris*. Peak at  $t_R = 24.80$  min appears on the chromatogram of the **FA** extract of *S. staminea* only.

**TABLE 3** Comparison of Common Peak Areas From the Fraction of Free Aglycons (FA) For Six Investigated Plants and Percentage Contributions of Peak Areas to the Respective Total Chromatograms Registered With Use of DAD at the Wavelength  $\lambda = 254$  nm

Species / Variety	Retention Time, $t_R$ [min]	Peak Area [mAV $\times$ min]	Percentage Contribution [%]
<i>Salvia triloba</i>	13.85	31.7	19.8
<i>Salvia staminea</i>		77.1	26.5
<i>Dracocephalum moldavica</i> (with white flowers)		16.7	11.0
<i>Dracocephalum moldavica</i> (with blue flowers)		11.3	8.4
<i>Thymus vulgaris</i>		27.0	13.5
<i>Thymus serpyllum</i>		6.5	7.5

Each signal corresponds with 40 mg plant dry matter.

Inspection of the chromatograms valid for **FA** and registered with use of ELSD reveals three peaks characteristic for certain groups of plants (or for individual plant), yet at the retention times ( $t_R$ ) different from those obtained with DAD (which are 3.80, 14.13, and 29.89 min, respectively). Peak at  $t_R = 3.80$  min is present on the chromatograms of the **FA** extracts from two *Salvia* and two *Dracocephalum* species. Peak at  $t_R = 14.13$  min appears on the chromatograms of two *Salvia* and two *Thymus* species. Peak at  $t_R = 29.89$  min is present on the chromatogram of the **FA** extract of *S. staminea* only.

**TABLE 4** Comparison of Characteristic Peak Areas From the Fraction of Free Aglycons (FA) For Six Investigated Plants Registered With Use of DAD at the Wavelength  $\lambda = 254$  nm

DAD		
Retention Time, $t_R$ (min)	Species / Variety	Peak Area (mAV $\times$ min)
16.38	<i>Dracocephalum moldavica</i> (with white flowers)	14.7
	<i>Dracocephalum moldavica</i> (with blue flowers)	3.6
20.48	<i>Dracocephalum moldavica</i> (with white flowers)	8.3
	<i>Dracocephalum moldavica</i> (with blue flowers)	7.5
	<i>Thymus vulgaris</i>	10.4
24.80	<i>Salvia staminea</i>	14.4
ELSD		
3.80	<i>Salvia triloba</i>	1.9
	<i>Salvia staminea</i>	31.3
	<i>Dracocephalum moldavica</i> (with white flowers)	4.7
	<i>Dracocephalum moldavica</i> (with blue flowers)	6.2
14.13	<i>Salvia triloba</i>	5.7
	<i>Salvia staminea</i>	16.8
	<i>Thymus vulgaris</i>	5.2
	<i>Thymus serpyllum</i>	0.7
29.89	<i>Salvia staminea</i>	66.3

Each signal corresponds with 40 mg plant dry matter.

The chromatograms registered with DAD for the four fractions (**FPA**, **APA**, **FGO**, and **FGB**) are quite similar to one another and therefore they can hardly discriminate among the six plants. Although the DAD chromatograms of the **BPA** fraction show certain qualitative and quantitative differences, the DAD chromatograms of the **FA** fraction (discussed in the earlier parts of this section) are the most characteristic ones in this sense that they univocally differentiate among the six closely related plants belonging to the *Lamiaceae* family and therefore they can be considered as marker fingerprints. The least dissimilarity of the **FA** fraction is observed for the two *D. moldavica* varieties (i.e., for those with white and blue flowers), which is understandable as they both represent one and the same species.

The analogical observations refer to the chromatograms of the six selectively extracted fractions registered with ELSD. In this case, the chromatograms of the three fractions (**FPA**, **FGO**, and **FGB**) show a considerable similarity for all the extracts and therefore they miss the discriminating property. The chromatograms of the **APA** and **BPA** fractions better differentiate among the six plants considered than the chromatograms valid for **FPA**, **FGO**, and **FGB**. However, the results obtained with ELSD confirm our earlier observation valid for DAD as to the highest degree of dissimilarity observed for the **FA** fraction. Again, the least dissimilar are the chromatograms of the **FA** fraction for the two varieties of the same species (*D. moldavica*). The HPLC results only confirm our earlier observations based on the TLC analysis that the chromatograms obtained for the **FA** fraction bear an importance of the marker fingerprints, able to differentiate among the closely related plants which belong to the *Lamiaceae* family.

## CONCLUSIONS

- It was the goal of this study to test chromatographic fingerprints obtained with use of TLC and HPLC for their performance in differentiating among the plants which are botanically closely related. As the test plants, we selected species belonging to the three genera (*Salvia*, *Thymus*, and *Dracocephalum*) from *Lamiaceae* family.
- In order to facilitate the task, we selectively extracted phenolic compounds, dividing them into the six different fractions.
- Each fraction was analyzed by means of TLC and HPLC (with two types of detector, DAD and ELSD).
- It was established that the chromatograms of flavonoid aglycons (**FA**), in spite of the lowest intensity of the respective signals originating both from TLC and HPLC, are the only ones which allow distinguishing among the selected plants belonging to the different genera from one

and the same *Lamiaceae* family. Consequently, these chromatograms can be regarded as marker fingerprints for the individual plant species.

## ACKNOWLEDGMENT

The work of M. Orłowska was partially supported by the PhD scholarship granted to her in 2012 by the Rector of the University of Silesia, Katowice, Poland.

## REFERENCES

1. Modnicki, D.; Balcerek, M. Estimation of Total Polyphenols Contents in *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. Commercial Samples. *Herba Polonica* **2009**, *55*, 35–42.
2. Hossain, M.; Dilip, K.; Brunton, N.; Martin-Diana, A.; Barry-Ryan, C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10576–10581.
3. Breverton, T. *Breverton's Complete Herbal. A Book of Remarkable Plants and Their Uses*. Quercus Publishing Plc.: London, 2011.
4. Najafi, M.; Ghasemian, E.; Fathiazad, F.; Garjani, A. Effects of Total Extract of *Dracopis moldavica* on Ischemia/Reperfusion Induced Arrhythmias and Infarct Size in the Isolated Rat Heart. *Iranian J. Basic Med. Sci.* **2009**, *11*, 229–235.
5. Chu, S. S.; Liu, S. L.; Liu, Q. Z.; Liu, Z. L.; Du, S. S. Composition and Toxicity of Chinese *Dracopis moldavica* (Labiatae) Essential Oil Against Two Grain Storage Insects. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 5262–5267.
6. Habibvash, E. N.; Rajamand, M. A.; Heidari, R.; Sarghein, S. H.; Ricani M. H. Chemical Analysis of Some *Salvia* Species Native to West Azarbaijan (Iran). *Pakistan J. Biol. Sci.* **2007**, *10*, 3516–3524.
7. Sujewicz, M.; Staszek, D.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska, T. Comparison of TLC and HPLC Fingerprints of Phenolic Acids and Flavonoids Fractions Derived from Selected Sage (*Salvia*) Species. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2012**, *35*, 1388–1403.
8. Jerzmanowska, Z. *Plant Material. The Isolation Methods (in Polish)*. PWN: Warszawa, 1967.
9. Świątek, L. The Iridoid Phenolic Acids and Glycosides in Certain Polish Medicinal Herbs from the *Plantago* Genus. *Herba Polon.* **1977**, *23*, 201–210.
10. Ibrahim, R. K.; Towers, G. H. The Identification by Chromatography of Plant Phenolic Acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *87*, 125–127.
11. Świątek, L.; Dombrowicz, E. Phenolic Acids in the Bitter Raw Materials. Part I. Analysis of the *Artemisia absinthium* Herb and the *Gentian* root. *Farm. Pol.* **1984**, *40*, 729–732.
12. Schmidlein, H.; Hermann, K. Quantitative Analysis for Phenolic Acids by Thin Layer Chromatography. *J. Chromatogr.* **1975**, *115*, 123–128.
13. Wójcik-Kosior, M.; Oniszczuk, A. In *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; Waksmundzka-Hajnos, M., Sherrin, J., Kowalska, T., Eds.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, Florida, 2008; pp 348.
14. Rijke de, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, E.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. Th. Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 31–63.
15. Cieśla, L.; Staszek, D.; Hajnos, M.; Kowalska, T.; Waksmundzka-Hajnos, M. Development of Chromatographic and Free Radical Scavenging Activity Fingerprints by Thin-Layer Chromatography for Selected *Salvia* Species. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22*, 59–65.

## Fingerprinting of the Volatile Fraction from Selected Thyme Species by Means of Headspace Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection

DOROTA STASZEK, MARTA ORLOWSKA, JÓZEF RZEPA, MICHAŁ S. WRÓBEL, and TERESA KOWALSKA<sup>1</sup>

University of Silesia, Institute of Chemistry, 9 Szkolna St, Katowice, Poland

GRAŻYNA SZYMCAK

Maria Curie-Skłodowska University, Botanical Garden, 3 Ślawnikowska St, 20-810 Lublin, Poland

MONIKA WAKSMUNDZKA-HAJNOS

Medical University of Lublin, Department of Inorganic Chemistry, 4A Chodźki St, 20-093 Lublin, Poland

The *Thymus* genus has a firm position in Mediterranean folk medicine and culinary tradition, and yet certain confusion is observed in its botanical taxonomy. Therefore, chemical analysis of secondary metabolites and selection of reliable chemotaxonomic markers can prove helpful. In this study, the volatile fraction derived from 20 different thyme specimens was analyzed by means of headspace GC with MS detection. From the obtained chromatographic fingerprints, the diversity of the volatile fraction originating from the different thyme species clearly emerged. Identification of volatile components was based on a software library of mass spectra. There was only one common component derived from all 20 investigated thyme species, i.e.,  $\beta$ -linalool. For three different *Thymus* species, a comparison was made of the performance of the headspace extraction and hydrodistillation. Characteristic differences in composition of the volatile fraction obtained with use of these two techniques were discussed. Finally, the obtained chromatographic fingerprints of the volatile fraction were analyzed by means of a chemometric approach (principal component analysis), in order to trace similarities in their chemical composition.

The name *Thymus* originates from the Greek word "thymon," meaning "for disinfection." Ancient Egyptians used thyme for embalming mummies. Ancient Greeks used it in their baths and burned it as incense in their temples, believing it was a source of courage. The origin of the *Thymus* genus is assumed to be located in South Europe, showing two different centers of origin, the Iberian Peninsula (together with Northwest Africa) and Balkan Peninsula. However, in Asia and North Europe certain species of *Thymus* are frequently also found. High variability in the shape and form of the *Thymus* genus has always raised problems for taxonomists with dividing it into the clearly defined species. As a result, large

numbers of individual species have been reported (1). The DNA-based molecular markers proved highly valuable in the genetic analysis of the *Thymus* taxa. Investigations were also performed for selected thyme species regarding their essential oil composition and genetic variability using DNA-based markers (2). The pattern of relatedness observed in chemical profiles coincides with the results obtained by essential oil profile analysis, although the similarities according to certain reports are only partial.

The species that belong to the *Thymus* genus are characterized by an extraordinary richness of essential oils. The volatile oil derived from thyme is strongly antiseptic, and, particularly, its main constituent (thymol) is a recognized and very effective antifungal. Thyme oil is germicidal and antibacterial. It is an energizing oil that can be used for local, respiratory, and systematic infections, as well as for stimulation of digestion, clear thinking, circulation, and mental balance. This oil also has an expectorant activity; it can expel worms and exert a tonic effect, support normal functioning of the body, and counteract the effects of aging.

The purpose of the present research was to examine chemical variability within the *Thymus* genus and to consider how the diversity in the essential oil composition is reflected in the fingerprints of different species growing in the same habitat of the Lublin region, Poland. The profiles of essential oils from the different *Thymus* specimens and species obtained by means of the headspace (HS) GC with MS detection (HS-GC/MS) can also be used for examination of the presence of pharmacologically active compounds contained therein.

### Experimental

#### Plant Material

Twenty samples of the different *Thymus* specimens and species investigated in this study were collected during the flowering stage (July, 2012) in the Botanical Garden of Maria Curie-Skłodowska University (Lublin, Poland). Botany specialists identified each investigated sample, and voucher specimens were deposited in the herbarium of the Botanical Garden. The investigated samples are listed in Table 1, and the origin of different specimens of one and the same species is explained in that table. The sample labeling system adopted in Table 1 was preserved throughout the whole study. Plant material was dried for 40 h in an oven with a forced air flow at 35 to 40°C.

Guest edited as a special report on "Chromatographic and Biological Fingerprinting of Herbal Samples" by Łukasz Cieřła and Monika Waksmundzka-Hajnos.

<sup>1</sup> Corresponding author's e-mail: teresa.kowalska@un.edu.pl

DOI: 10.5740/jaoacint.SGESaszek







Then the obtained dry material was stored in a refrigerator until the start of the analysis. Finally, 1.5 g samples of each plant were powdered in an electric grinder (Bosch, Stuttgart, Germany), weighed, and placed in 10 mL glass vials stoppered with a silicon-teflon septum (Thermo Scientific, Waltham, MA) for the HS-GC analysis. For vapor distillation in the Deryng apparatus (ChemLand, Stargard Szczeciński, Poland), 25 g of the three plant species [*T. vulgaris* (C), *T. kosteleckyana* (R), and *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* (T)] was powdered in an electric grinder and weighed. In the case of both analysis types, three replicates of each sample were processed in an identical way.

#### Isolation of Essential Oils

(a) *Vapor distillation in the Deryng apparatus.*—The dried plant material (25 g) was placed in a 500 mL round-bottomed flask, and 300 mL water was added. Vapor distillation was performed for 3 h by use of the Deryng apparatus. The contents of the essential oil were measured according to the indirect *m*-xylene based procedure described in the Polish Pharmacopoeia VI (3). The overall volume of each isolated essential oil fraction (including *m*-xylene) was equal to approximately 0.70 mL. The isolated fractions were dried with anhydrous sodium sulfate and then dissolved in methanol to obtain the 1% (v/v) solutions. Aliquots (1  $\mu$ L) of these solutions were analyzed by means of GC/MS.

(b) *HS extraction.*—Each sample was placed in the gas chromatograph autosampler thermostat and heated at 100°C for 15 min. The 500  $\mu$ L gaseous phase present above the botanical material surface was automatically introduced into the gas chromatograph coupled with a mass spectrometer.

#### GC/MS and HS-GC/MS Analysis

GC/MS and HS-GC/MS were performed by use of a Trace Model 2000 capillary gas chromatograph with an MS Trace model mass detector (ThermoQuest, Waltham, MA) equipped with a CTC Analytics autosampler (Combi PAL, Basel, Switzerland), working in the HS and non-HS modes. Compounds were separated on a 30 m  $\times$  0.25 mm id DB-5 capillary column (film thickness 0.25  $\mu$ m; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, formerly J&W Scientific, Folsom, CA). Helium (pressure = 100 kPa) was used as the carrier gas. The oven temperature was maintained at 40°C for 3 min after the injection and then programmed at 8°C min to 200°C, which was held for 15 min. The temperature of the injector was kept constant at 200°C. The mass spectrometer was equipped with an electron impact source operated at 70 eV.

#### Identification of Compounds

Identification of individual volatile compounds was based on a comparison of the mass spectra recorded for the individual chromatographic peaks with those available from the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD) software library. In the case of two pairs of structural isomers (*o*-cymene and *m*-cymene, and thymol and carvacrol), identification based on a comparison of the recorded mass spectra with those derived from the software library could not be certain, so we limited ourselves to an "and/or" suggestion.

An overall number of 29 identified compounds are listed in Table 1.

#### Chemometric Evaluation of Chromatographic Fingerprints

Chemometric evaluation of the chromatographic fingerprints registered by means of HS-GC/MS and for the volatile fraction of the investigated thyme species was performed via R2010a Matlab by MathWorks (Natick, MA) and its toolboxes.

#### Result and Discussion

##### HS-GC/MS and Deryng-GC/MS Fingerprinting

In the first step of the experiment, three different thyme species [i.e., *T. vulgaris* (C), *T. kosteleckyana* (R), and *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* (T)] were used to compare the efficiency of isolating the volatile fraction from the plant material carried out by means of the two methods. In the first case, the analysis was carried out by means of HS-GC/MS, and in the second case, the fraction was isolated by hydrodistillation in the Deryng apparatus and the obtained essential oil was characterized by means of GC/MS. The obtained chromatograms are shown in Figure 1.

A comparison of the pair of the chromatograms for *T. vulgaris* (C) allowed formulation of the following observations. When applying the HS-GC/MS method, 19 volatile compounds were identified. Peaks No. 8 (*o*-cymene and/or *m*-cymene) and 10 (eucalyptol) had the highest intensities. With use of the Deryng-GC/MS method, 12 volatile compounds were identified, and peak No. 8 showed the highest intensity. With the aid of HS-GC/MS, peaks No. 4 (1-octen-3-ol), 6 (3-octanol), 10 (eucalyptol), 12 ( $\beta$ -terpineol), 13 ( $\beta$ -linalool), 17 (linalyl anthranilate), 19 ( $\beta$ -bourbonene), and 23 (germacrene D) were identified; they were absent from the samples extracted by means of the Deryng method. Peak No. 29 (caryophyllene oxide) was identified in the sample extracted by the Deryng method only.

Then we compared the pair of chromatograms for *T. kosteleckyana* (R). By means of HS-GC/MS, 16 volatile compounds were identified and peak No. 10 (eucalyptol) was the most intense. By means of Deryng-GC/MS, 14 compounds were identified, and Nos. 10 (eucalyptol) and 27 (nerolidol) had the highest intensities. By HS-GC/MS, four compounds were identified that did not appear in the Deryng-GC/MS chromatograms (Nos. 3, 6, 11, and 12, i.e., camphene, 3-octanol,  $\alpha$ -terpinen, and  $\beta$ -terpineol, respectively). With the Deryng-GC/MS method, peak Nos. 8 and 18 (*o*-cymene and/or *m*-cymene, and carvacrol and/or thymol, respectively) were identified, which were absent from the HS-GC/MS chromatograms.

*T. pulegioides* subsp. *pulegioides* (T) was the third thyme species used as a test plant to compare the efficacy of HS-GC/MS and Deryng-GC/MS. By means of Deryng-GC/MS, 11 volatile compounds were identified, and with use of HS-GC/MS, four more compounds were found (i.e., peak Nos. 1, 7, 12, and 13, identified as 3-thujene,  $\alpha$ -terpinen,  $\beta$ -terpineol, and  $\beta$ -linalool, respectively).

Summing up, with each investigated thyme specimen listed in Table 1, the HS-GC/MS method provided a higher number of the



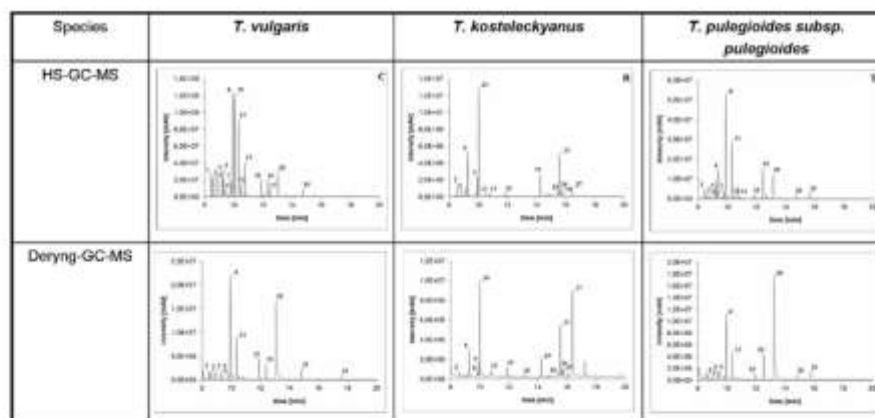


Figure 1. Comparison of chromatograms showing volatile compounds extracted from *T. vulgaris* (C), *T. kosteleckyana* (R), and *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* (T) by use of HS extraction and vapor distillation in the Deryng apparatus. Symbols of the thyme specimens and compound numbers as in Table 1.

volatile fraction components than Deryng-GC/MS. However, in the case of *T. vulgaris* (C) and *T. kosteleckyana* (R), certain compounds were identified by means of Deryng-GC/MS that were absent from the essential oil samples analyzed by means of HS-GC/MS. The following reasons seem responsible for the observed discrepancies. The Deryng hydrodistillation apparatus is an open system, so that a good chance exists for the most volatile compounds to escape through the condenser, and as a consequence, their signals are missing from the respective chromatograms. To the contrary, in the case of HS-GC/MS, it is possible that the missing compounds are those that are the least volatile and remain in the herbal material when the HS extraction is carried out at a temperature too low and/or for a too short a period of time.

The results of a comparison of the two extraction methods used with the raw plant material (and in the first instance, a higher number of the identified compounds in the case of HS-GC/MS) are witness to the fact that the HS extraction is faster and more efficient than Deryng-GC/MS. However, these two methods can be regarded as complementary, able to provide more complete information about the chemical composition of the volatile fraction than either one of them individually.

#### HS-GC/MS Analysis of 20 Thyme Specimens

Table 1 shows the HS-GC/MS results for the volatile fraction derived from all the investigated thyme samples. Thus, these plants can be compared in terms of the number and type of the identified compounds. Moreover, semiquantitative assessment was also made in form of the percentage contribution of the individual peak heights to the sum of all peak heights in a given chromatogram.

The HS-GC/MS chromatograms obtained for all thyme species listed in Table 1 are shown in Figure 2. A comparison of the chromatograms obtained for *T. vulgaris* (samples C and U) points to the difference in composition of the two investigated samples. Herbal material collected in the Botanical Garden (sample C) and containing stems and leaves was characterized

by the presence of linalyl anthranilate and germacrene D, which were absent from sample U. In sample U (originating from a supermarket), camphor,  $\beta$ -bisabolene,  $\tau$ -muurolene and/or  $\tau$ -cadinene, and caryophyllene oxide were detected, which were absent from sample C. Perceptible differences appeared among chromatographic peaks from samples C and U. With the sample originating from the Botanical Garden (sample C), the most intense peaks were No. 8 (*o*-cymene and/or *m*-cymene) and No. 10 (eucalyptol), and with the sample originating from a supermarket, the most intense peak was No. 18 (carvacrol and/or thymol). If we compare the intensities of peak No. 18 for the two *T. vulgaris* samples, it becomes evident that the content of carvacrol and/or thymol in the commercial sample was almost double that originating from the Botanical Garden sample. In spite of the described differences in qualitative and quantitative composition of the volatile fraction isolated from samples C and U, these two specimens showed certain similarity, as proved by chemometric evaluation including them in the same Group 2 (the results of chemometric analysis are discussed in the next section).

A comparison of the chromatograms obtained for *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* (samples F and T) also reveals differences in composition of the volatile fraction. Sample F (originating from the commodity plot within the Botanical Garden) contained  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -bourbonene,  $\tau$ -muurolene and/or  $\tau$ -cadinene, and caryophyllene oxide, not identified in sample T. However, differences in the intensities of the peaks identified in both samples were not as strongly pronounced as in the previously discussed case. Also, the two different specimens of *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* were chemometrically included in the same Group 3.

A comparison of the chromatograms obtained for *T. citrodorus* 'golden dwarf' (samples G and O) points to the difference in composition of the volatile fraction. Sample G (stems and leaves) contained 3-octanol,  $\alpha$ -terpinen, *o*-cymene and/or *m*-cymene, eucalyptol, 2-isopropyl-5-methyl-anisole, and carvacrol and/or thymol, which were absent from sample O (both samples originated from the Botanical Garden). In sample O (rhizome),  $\beta$ -pinene, limonen, farnesene, germacrene D, germacrene D

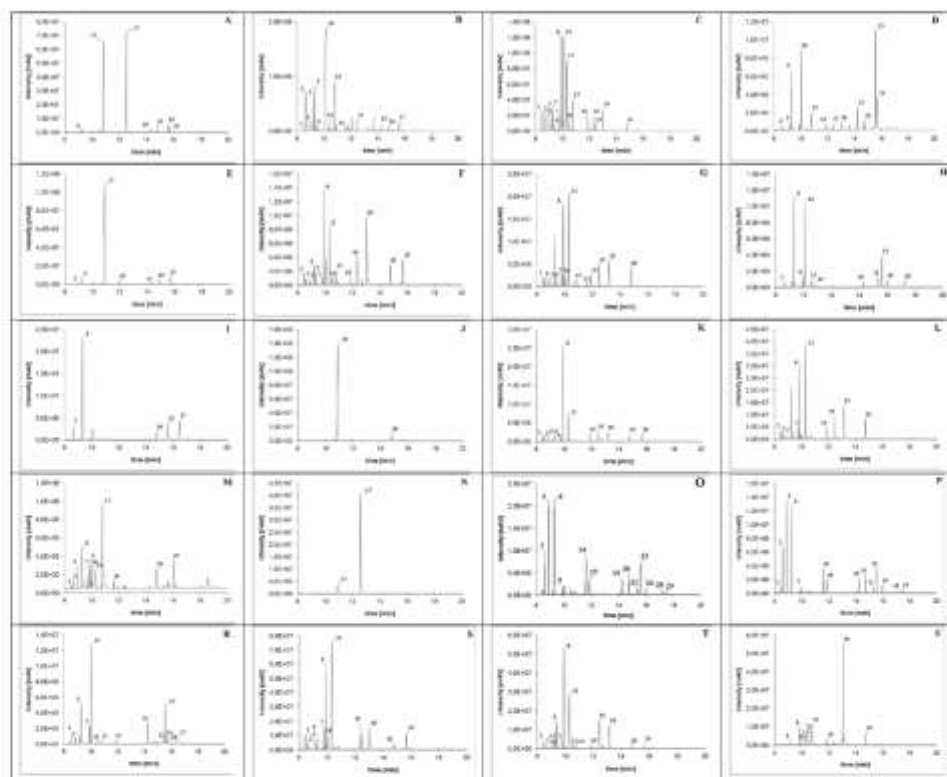


Figure 2. Gas chromatograms of the volatile fraction derived by means of HS-GC/MS for the *Thymus* species. A = *T. serpyllum* L., B = *T. serpyllum* albus, C = *T. vulgaris*, D = *T. austriacus*, E = *T. pseudolanuginosus*, F = *T. pulegioides* subsp. *pulegioides*, G = *T. citrodorus* 'golden dwarf', H = *T. pannonicus*, I = *T. tiffelsiensis*, J = *T. degenii*, K = *T. alpestris*, L = *T. serpyllum* aureus, M = *T. praecox* pygmaeus, N = *T. praecox* subsp. *arcticus*, O = *T. citrodorus* 'golden dwarf' (rhizome), P = *T. serpyllum* L., R = *T. kosteleckyianus*, S = *T. marshallianus*, T = *T. pulegioides* subsp. *pulegioides*, U = *T. vulgaris*. Symbols of the thyme specimens and compound numbers as in Table 1.

4-ol, and caryophyllene oxide were detected, but were absent from sample G. With sample G, the most intense peaks were those of *o*-cymene and/or *m*-cymene and  $\tau$ -terpinen, and with sample O, the most intense peaks were those of camphene and  $\beta$ -pinene. In spite of evident qualitative and quantitative differences (mostly because different parts of the plant were analyzed), the respective chromatograms showed considerable similarity. This impression based on visual comparison was later confirmed by chemometric analysis, so that samples G and O were classified in the same Group 2.

Considerable differences in chemical composition were revealed when comparing two specimens of *T. serpyllum* L. (samples A and P), and the other two varieties of the same species, i.e., *T. serpyllum* albus (sample B) and *T. serpyllum* aureus (sample L). First, samples A and P were compared, and they were strikingly different. The only detected volatile components that these two specimens shared in common were  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -linalool,  $\beta$ -bourbonene, caryophyllene, and germacrene D. Then two other varieties were compared, and namely samples B and L. In *T. serpyllum* albus (sample B),  $\beta$ -pinene, camphor, linalyl anthranilate, farnesene, germacrene

D, and  $\tau$ -elemene were identified (not present in sample L). In *T. serpyllum* aureus (sample L), *o*-cymene and/or *m*-cymene, carvacrol and/or thymol, and  $\tau$ -muurolene and/or  $\tau$ -cadinene were detected (absent from sample B). Considerable qualitative and quantitative differences among the four investigated *T. serpyllum* specimens were later confirmed by chemometric classification. Thus, sample A was ascribed to Group 1, sample L to Group 2, and samples B and P to Group 3. It can be speculated that several important factors are responsible for the observed diversity of the volatile fraction among the analyzed *T. serpyllum* specimens. One such factor can be, e.g., a different access of certain plants to sunlight (as specimens L and P were grown among the trees of the 'arboretum' plot in the Botanical Garden).

Careful analysis of the data collected in Table 1 allows a conclusion that there is only one common compound present in all the investigated volatile fractions, i.e.,  $\beta$ -linalool. Moreover, in only 10 out of 20 different thyme specimens did carvacrol and/or thymol appear in quantifiable amounts. This is a somewhat surprising outcome, especially in view of the fact that the *Thymus* genus derives its name from thymol as its most

recognizable fragrant component. Based on the results collected in Table 1, chemometric evaluation was also performed of the chromatographic fingerprints for all the investigated thyme species, and the results are given in the next section.

#### Chemometric Evaluation of Chromatographic Fingerprints

In this section, a short description of the signal preprocessing methods aimed at the later principal component analysis (PCA) is first provided, prior to discussing the results obtained. The chromatograms treated as chromatographic fingerprints usually require background and noise removal and peak alignment prior to comparative PCA analysis. In the particular case of this study, the first two steps were abandoned, due to the rather smooth character of the obtained GC/MS signals. Nevertheless, background elimination [with use of the penalized asymmetric least squares approach proposed by Eilers (4)] was tried, although no significant results were achieved. An approach to suppress noise in the signals with use of the Savitsky-Golay filters (5, 6) was tried as well, but it also failed to provide any significant improvement. However, peak alignment was indispensable.

Because of the many physicochemical relationships governing chromatographic systems, chromatographic signals usually have to be aligned (7). The fingerprint alignment eliminates peak shifting, which results from different sources of instrumental variation (e.g., the column aging phenomena that generate difficulties in reproducing virtually identical gradient conditions and with keeping identical working temperatures). Peak shifting causes serious problems for the subsequent data analysis and exploration. To overcome this problem, many alignment techniques have been proposed in the literature (e.g., 4, 8–13). However, the correspondence of peaks most often remains unknown, so that the peak alignment is not an easy job. Among a number of methods that are applied for alignment, correlation optimized warping (COW; 8) is frequently chosen for a variety of practical applications. In this case, no presumptions about the signals are required. Using the COW method, peaks in a signal,  $P$ , are matched with their counterparts in the target signal,  $T$ . Then, piecewise linear stretching and compression of signal  $P$  is performed, so that the correlation coefficient between signals  $P$  and  $T$  is maximized. In this alignment technique, two input variables (i.e., the section length,  $N$ , and the so-called slack variable, denoted as  $t$ ) control the quality of the alignment. Initially, chromatograms  $P$  and  $T$  are divided into  $N$  sections, each with its start and end points. All sections in signal  $P$  are later aligned by changing the positions of the end points. If  $t = 1$ , end points of each section can have one of three locations ( $-1, 0, 1$ ), which practically means that the section is shortened by one point, remains unchanged, or it is extended by one point, respectively. Finally, the standard normal variate transformation is applied to the signals (14), which allows removal of the other undesired effects that could still be present in raw data. The pretreated data are used as input data for PCA.

PCA is a data exploration and visualization technique (15). It permits construction of a set of new variables called principal components (PCs). The PCs are the orthogonal vectors that are linear combinations of the original variables and represent the data structure by maximizing the description of data variance. The PCA model consists of  $k$  principal components, where  $k$

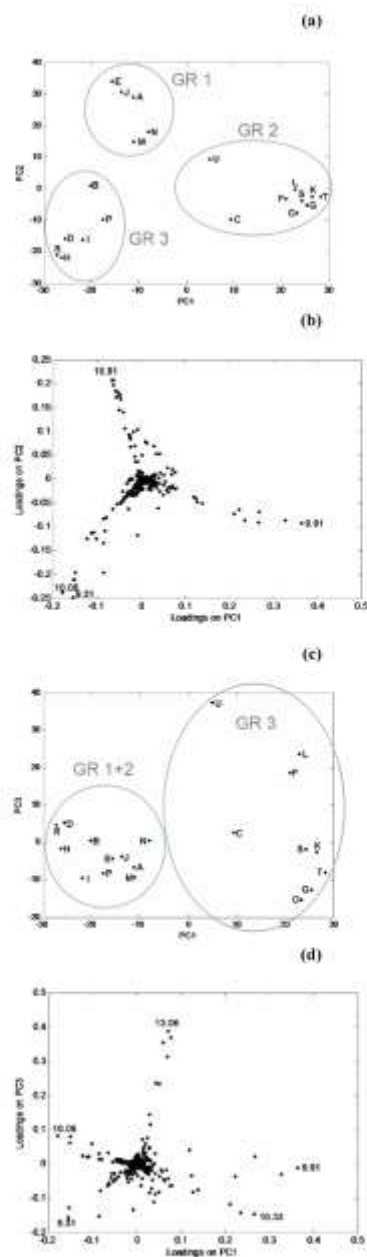


Figure 3. (a) The PC1–PC2 score plot for the chromatographic fingerprints; (b) projection of the loadings on the space of the first two PCs; (c) the PC1–PC3 score plot for the chromatographic fingerprints; (d) projection of the loadings on the space of the first and third PCs. Symbols of the thyme specimens as in Table 1.

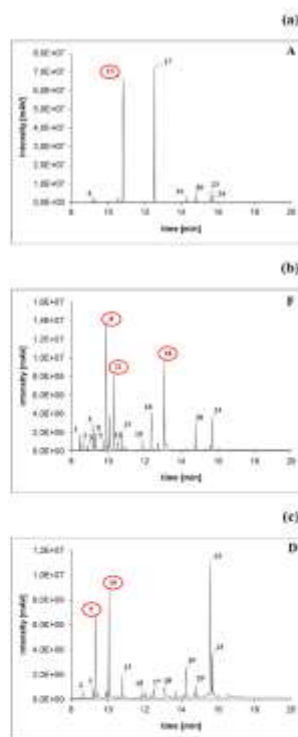


Figure 4. The HS-GC/MS fingerprints for the selected thyme species: Species A from Group 1, species F from Group 2, and species D from Group 3 [see the PC1–PC2 score plot in Figure 3(a)]. The thyme species are labeled with capital letters, as explained in Table 1. The chromatographic peaks that determine placement of all thyme species in a given PC1–PC2 group are marked with an oval. Peak No. 13 ( $\beta$ -linalool), characteristic of Group 1; peaks No. 9, 11, and 18 (*o*-cymene and/or *m*-cymene,  $\gamma$ -terpinen, and carvacrol and/or thymol, respectively), characteristic of Group 2; peaks No. 5 and 10 ( $\beta$ -pinene and eucalyptol, respectively), characteristic of Group 3. Symbols of the thyme specimens as in Table 1.

is selected by the user. The original data matrix  $X$  ( $m \times n$ ) is decomposed according to the following equation:

$$X = TP^T + E$$

where  $T$  ( $m \times k$ ) is the matrix of scores,  $P$  ( $n \times k$ ) is the matrix of loadings,  $E$  ( $m \times n$ ) is the residual matrix, and the superscript  $T$  denotes transposition of the matrix. As a projection method, PCA enables projection of the objects or variables on the planes that they define (16). Projection of the samples on the plane defined by the selected pairs of PCs allows study of the similarities among the samples in the form of score plots. The loading plots are the projections of the variables on the planes of the selected PCs, and they allow tracing correlations among data variables.

Starting data preprocessing, individual fingerprints were prepared to make further processing possible, and in this particular study, 20 fingerprints (one for each individual thyme

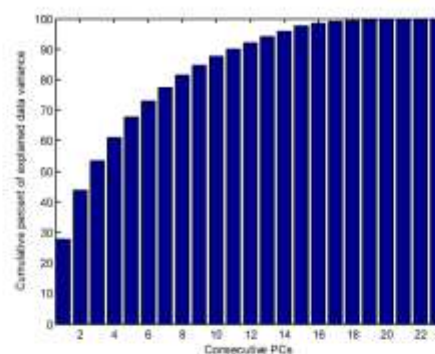


Figure 5. The cumulative percentage of the explained data variance by the consecutive PCs.

specimen) were considered. Each fingerprint consisted of 2720 points recorded in the course of analysis. Applying the COW method, the initial parameters of the section length,  $N$ , and the so-called slack variable,  $t$ , were set in the range of  $N = 30 \div 100$  and  $t = 1 \div 8$ . After adjusting these parameters, the final values were established as equal to  $N = 80$  and  $t = 3$ . At that point, the peak shifting decreased to a minimum, and further data exploration and analysis were made possible by means of PCA. Its aim was to reveal similarities and differences among the chromatographic fingerprints valid for the volatile fraction derived from the 20 investigated thyme samples.

The first three PCs (PC1, PC2, and PC3) described approximately 53.4% of the data variance. On the PC1–PC2 projection (Figure 3a), 20 investigated thyme specimens were classified into the three groups (Group 1, 2, and 3), and on the PC1–PC3 projection (Figure 3b), only two separate groups were observed (because Group 1 merged with Group 2). On the loading plots (Figure 3b and d), the dotted “whiskers” indicate those volatile fraction compounds that diversify the samples [as each dot is valid for a given retention time ( $t_R$ )]. The total of six different compounds with the relatively highest intensities of their respective peaks (the corresponding  $t_R$  values indicated in Figure 3b and d) enabled classification of the 20 thyme specimens into the three groups. These six compounds were marked with ovals on the selected chromatograms presented in Figure 4. All thyme species belonging to Group 1 differ from those falling in Groups 2 and 3 with an intense peak at  $t_R = 10.80$  min, ascribed to  $\beta$ -linalool and absent from the remaining two groups (Figure 4a). All thyme species belonging to Group 2 are characterized by three intense peaks at  $t_R$  equal to 9.92, 10.33, and 13.12 min, ascribed, respectively, to *o*-cymene and/or *m*-cymene,  $\gamma$ -terpinen, and carvacrol and/or thymol, which are absent from Groups 1 and 3 (Figure 4b). Finally, the thyme species belonging to Group 3 are characterized by the presence of two intense peaks at  $t_R$  equal to 9.31 and 10.06 min (Figure 4c). These two peaks are identified as  $\beta$ -pinene and eucalyptol, respectively, and they are absent from Groups 1 and 2. The cumulative percentage of the explained data variance by the consecutive PCs is given in Figure 5.

## Conclusions

The following are the conclusions of this study: HS-GC/MS provided a higher number of the volatile fraction components than Deryng-GC/MS; careful analysis of the obtained data allows a conclusion that there is only one common compound present in all investigated volatile fractions, *l*-linalool; only 10 out of 20 different thyme specimens showed identifiable contents of carvacrol and/or thymol, which is a somewhat surprising result (especially in view of the fact that the *Thymus* genus derives its name from thymol as the most recognizable fragrant component); and chemometric analysis enabled use of these components of the volatile fraction for classification of 20 different thyme specimens into the three distinct groups.

## References

- (1) Tiinen, G., Kirimer, N., & Baser, K.H.C. (1995) *Chem. Nat. Comp.* **31**, 42–47. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01167569>
- (2) Plahit, Z., Kocsis, M., Kuczmog A., Csete, S., Sinkó, H., Sárosi, Sz., Molnár, P., & Horváth, G. (2012) *Acta Biol. Hung.* **63**, 81–96. <http://dx.doi.org/10.1556/ABiol.63.2012.1.7>
- (3) *Polish Pharmacopoeia VI* (2002) Polish Pharmaceutical Society, Warsaw, Poland
- (4) Eilers, P.H.C. (2004) *Anal. Chem.* **76**, 404–411. <http://dx.doi.org/10.1021/ac034800e>
- (5) Thekkudan, D.F., & Rutan, S.C. (2009) in *Comprehensive Chemometrics*, Vol. 2, S.D. Brown, R. Tauler & B. Walczak (Eds), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp 9–24. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00098-3>
- (6) Trygg, J., Gabrielson, J., & Lundstedt, T. (2009) in *Comprehensive Chemometrics*, Vol. 2, S.D. Brown, R. Tauler & B. Walczak (Eds), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00097-1>
- (7) Malmquist, G., & Danielsson, R. (1994) *J. Chromatogr. A* **687**, 71–88. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)00726-8](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(94)00726-8)
- (8) Nielsen, N.-P.V., Carstensen, J.M., & Smedsgaard, J. (1998) *J. Chromatogr. A* **805**, 17–35. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00021-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00021-1)
- (9) Walczak, B., & Wu, W. (2005) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **77**, 173–180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.07.012>
- (10) van Nederkassel, A.M., Daszykowski, M., Eilers, P.H.C., & Vander Heyden, Y. (2006) *J. Chromatogr. A* **1118**, 199–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.114>
- (11) Forshed, J., Schuppe-Koistinen, L., & Jacobsson, S.P. (2003) *Anal. Chim. Acta* **487**, 189–199. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00570-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00570-1)
- (12) Jellema, J.H. (2009) in *Comprehensive Chemometrics*, Vol. 2, S.D. Brown, R. Tauler & B. Walczak (Eds), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp 86–108
- (13) Pravdova, V., Walczak, B., & Massart, D.L. (2002) *Anal. Chim. Acta* **456**, 77–92. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00008-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00008-9)
- (14) Barnes, R.J., Dhanoo, M.S., & Lister, S.J. (1989) *Appl. Spectrosc.* **43**, 772–777. <http://dx.doi.org/10.1366/0003702894202201>
- (15) Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2**, 37–52. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](http://dx.doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)
- (16) Daszykowski, M., Walczak, B., & Massart, D.L. (2003) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **65**, 97–112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439\(02\)00107-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439(02)00107-7)



## Optimization of Extraction Based on the Thin-Layer Chromatographic Fingerprints of Common Thyme

MARTA ORŁOWSKA, IVANA STANIMIROVA, DOROTA STASZEK, MIECZYSLAW SAJEWICZ, and TERESA KOWALSKA<sup>1</sup>

University of Silesia, Institute of Chemistry, 9 Szkolna St, Katowice, Poland

MONIKA WAKSMUNDZKA-HAJNOS

Medical University of Lublin, Department of Inorganic Chemistry, 4 A, Chodźki St, 20-093 Lublin, Poland

The main goal of this study was to establish the optimum accelerated solvent extraction (ASE) conditions for the isolation of the total phenolics contained in common thyme (*Thymus vulgaris* L.) based on the results of TLC. Additionally, two different extraction methods, i.e., Soxhlet extraction and ASE, were compared in terms of their relative performance. Binary methanol–water mixtures in different volume proportions were used as the extraction solvents. Thirteen experiments utilizing different methanol concentrations and different extraction temperatures were designed using response surface methodology. Additionally, the temperature dependence of rosmarinic and caffeic acid extraction yields was analyzed by applying HPLC. Finally, the optimum working conditions established within the framework of the assumed central composite experimental design were determined to be 27% methanol at 130°C. It was found that the extraction carried out by ASE provided higher total phenolic yields than that done in the Soxhlet apparatus. The final aim of this study was a comparison of the six different *Thymus* species in terms of their total phenolic content and their TLC fingerprints. It was found that the phenolic content of four species, *T. pulegioides*, *T. kosteleckyianus*, *T. citriodorus*, and *T. marschallianus*, differs from the phenolic content of *T. vulgaris* and *T. serpyllum*.

acids (mainly rosmarinic and caffeic acid); and flavonoids. The essential oils that are derived from the thyme species have found numerous applications in pharmacology, medicine, and cosmetics, mainly due to their antibacterial, antifungal, and antioxidative properties. The thyme plant as a whole exerts a benign influence on the human body, basically due to its antiseptic, expectorant, antibacterial, and antioxidative properties (2–6). The chemical composition of the plant material is influenced by numerous factors such as geographical and climatic zone and harvesting period. As a consequence, considerable differences are observed among the different species of thyme (7, 8).

Polyphenols form a group that consists of phenolic acids, flavonoids, and lignins. These are produced in different parts of a plant, and the main sources of their intake in the human diet are vegetables, fruits, cereals, and spices (9). The quantity of phenolics and their structure (e.g., the number and position of the hydroxyl groups in a molecule) significantly influence the pharmacological properties of a given botanical material, and these are strictly related to their origin (10). The identified components of common thyme consist of phenolic acids (mainly, rosmarinic and caffeic acid), flavonoids (flavones and flavanones), and monoterpenes (11).

Antioxidant properties are the most important among the numerous pharmacological properties of phenolic acids. Water, methanol, ethanol, and acetone are the most frequently used solvents (12–14) to isolate the phenolics from botanical material to further assess their antioxidative properties.

The basic techniques that are applied to isolate chemical compounds from plant material include extraction in the Soxhlet apparatus (15, 16). Due to the relatively long extraction time that is needed when the Soxhlet apparatus is used, and to the considerable amounts of the samples and consumed extractants, this technique tends to be replaced by more modern isolation approaches, one of which is known as the accelerated solvent extraction (ASE). The most valuable characteristics of ASE are the lower solvent consumption and a considerably shorter working time than is necessary with traditional extraction techniques (17). This efficiency is achieved because the solvents (or solvent mixtures) that are utilized as the ASE extractants operate under an elevated pressure and thus, above their boiling point.

For the isolation and identification of individual phenolic compounds, analytical techniques such as HPLC (18, 19), ultra-performance LC (20), GC/MS (21), or TLC (21) are usually used. The aim of this study was to optimize the ASE method of extracting the phenolics derived from common thyme (*T. vulgaris* L.) and to describe a simple, low cost, and robust method that can be used to separate the extracted phenolics. Therefore, before the extraction of the phenolics from the six different thyme species, the basic parameters of the extraction process (i.e., the working

Plants belonging to the Lamiaceae family are highly differentiated in morphological terms. According to the most up-to-date classification, this family includes approximately 252 genera and 6700 species (1). Due to the rich and diverse chemical composition of Lamiaceae plants, many research groups focus on investigating the chemical composition of different species and the species groups. Thyme (*Thymus*) is an interesting genus that belongs to the Lamiaceae family, and its natural habitat is in Europe, Asia, and North Africa. Approximately 350 species are included in the thyme genus, and the most common species is known as common or garden thyme (*T. vulgaris* L.). The main components of the different thyme species are essential oils (they contain from 20 to 54% thymol, but also *p*-cymene, borneol, and myrcene); phenolic

Guest edited as a special report on "Chromatographic and Biological Fingerprinting of Herbal Samples" by Łukasz Cieśla and Monika Waksmundzka-Hajnos.

<sup>1</sup> Corresponding author's e-mail: teresa.kowalska@us.edu.pl

DOI: 10.5740/JAOACINT.SGEOrłowska

**Table 1. Methanol concentrations and extraction temperatures obtained from RSM**

Run	Methanol, %	Temperature, °C
1	35	80
2	55	105
3	75	80
4	55	105
5	35	130
6	55	105
7	75	130
8	55	140
9	55	105
10	27	105
11	55	70
12	85	105
13	83	105

temperature and quantitative proportions of water and methanol) were optimized using central composite design (CCD). The analytical signals that were used for the optimization were derived from the densitometrically scanned thin layer chromatograms (i.e., the densitograms) that had been obtained for the extracted fraction of the total phenolics, similar to the procedure described earlier (22). The separation technique of choice was TLC, which fulfills the requirements of simplicity, robustness, and cost-friendliness (23). The results of Soxhlet and ASE extraction were then compared. Finally, the fractions of phenolics that were isolated from the six different thyme species by means of ASE were compared using the TLC fingerprints.

## Experimental

### Herbal Materials and Reagents

All of the herbs used in this study belonged to the mint (Lamiaceae) family. In order to optimize the extraction method, commercial samples of common thyme (*T. vulgaris* L.) were used. A comparison of the total phenolic content was carried out for the six different thyme species (*T. vulgaris*, *T. serpyllum*, *T. pulegioides*, *T. kosterlekyanus*, *T. citriodorus* "golden dwarf," and *T. marshallianus*) that originated from the Botanical Garden of the Maria Skłodowska-Curie University (Lublin, Poland). They were harvested in July 2012, and dried for 40 h in an oven with a forced air flow at 35 to 40°C. The dried herbs were ground and stored in a refrigerator until the commencement of the experiments.

The following reagents of the analytical purity grade (purchased from PPH POCh, Gliwice, Poland) were used: acetone, formic acid, acetic acid, ethyl acetate, methanol, *n*-hexane, and sulfuric acid. In addition, the rosmarinic and caffeic acid standards were purchased from ChromaDex (Santa Ana, CA) and dissolved in methanol. Their respective concentrations were 1 mg/mL. Water used for the preparation of the binary extraction mixtures was

**Table 2. Accelerated solvent extraction conditions**

ASE conditions	
Gas	Nitrogen
Washing	Three times
Pressure, atm	100
Heating period, min	5
Static period, min	5
No. cycles	5
No. repetitions	3

double distilled and deionized under laboratory conditions using an Elix Advantage model Millipore system (Molsheim, France).

### ASE

The ASE was carried out using an ASE 200 model apparatus (Dionex, Sunnyvale, CA). Before the ASE extraction, herbal material was preprocessed. To do that, 8 g portions of dried and ground plant material were macerated for 24 h with *n*-hexane under reflux in a round-bottom flask. This was followed by an exhaustive extraction under the same working conditions for a period of approximately 40 h to at least partially remove the lipids and chlorophyll from the plant samples. The preprocessed herbal material was dried, and portions of 0.5 g were weighed out and placed in the stainless steel cells of the apparatus. The quantitative composition of the extraction mixtures and the working temperatures were chosen according to response surface methodology (RSM) using CCD. The complete CCD design consisted of 13 experimental runs with five repetitions of the central point (55% methanol and 105°C). The combinations of the methanol concentrations and the extraction temperatures that were used are given in Table 1. ASE was carried out under the working conditions that are summarized in Table 2.

At each individual experimental step, the cells were washed with a fresh portion of solvent and flushed with nitrogen for 90 s. The resulting extracts (in 37 mL aliquots) were kept in a refrigerator in amber glass vessels until the commencement of the chromatographic analyses. Two extracts (sample batches) were prepared in each experimental run with the exception of runs 2, 4, 6, 9, and 12 (Table 1) in which one extract was obtained. This resulted in a total of 21 extracts.

### Extraction in a Soxhlet Apparatus

Five-gram portions of the ground herbal material were introduced into paper cartridges in the Soxhlet apparatus and macerated with *n*-hexane for 24 h. Then, in order to partially remove lipids and chlorophyll, an exhaustive extraction with *n*-hexane was continued for approximately 35 h. The herbal material was then dried, again introduced in paper cartridges into the Soxhlet apparatus, and macerated with pure methanol for 24 h, followed by an exhaustive methanol extraction for approximately the next 35 h. The resulting extracts were kept in a refrigerator in amber glass vessels until the commencement of

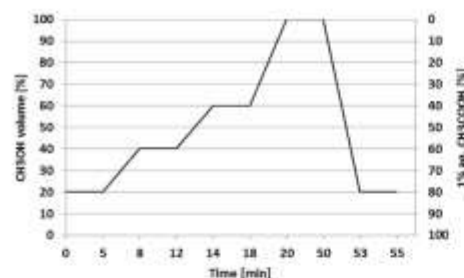


Figure 1. The gradient profile used in the HPLC analysis.

the chromatographic analyses. The experiment was performed in triplicate.

#### TLC

TLC was carried out in horizontal sandwich type chambers that were manufactured by Chromdes (Lublin, Poland). Prior to the analysis, the chambers were saturated with mobile phase vapors for 15 min. Chromatographic glass plates that were precoated with silica gel 60 F<sub>254</sub> (10 × 20 cm; Merck, Darmstadt, Germany; Cat. No. 1.05729) and activated for 15 min at 110°C in the S-40 model lab dryer (Alpina, Poland) were used. Herbal extracts were manually applied to the plates in 10 µL aliquots with the use of glass capillaries. Ethyl acetate–formic acid–acetic acid–water (100+11+11+13, v/v/v/v) was used as the mobile phase. Chromatograms were developed to a distance of 15 cm and dried in ambient air for 2 h. Finally, the chromatograms were visualized by spraying the plates with a 10% methanol solution of sulfuric acid, followed by heating at 110°C for 20 min. Quantitative

evaluation of the chromatograms was carried out using a model CD 60 scanning densitometer equipped with Windows compatible ProQuant software (Desaga, Heidelberg, Germany). Each sample was characterized by a series of densitograms that were recorded every 10 nm within the range of 320 to 700 nm (an example of a TLC image is presented in Figure 1a). Taking into account the fact that each extract (batch) that was obtained either from ASE or the Soxhlet apparatus was analyzed in duplicate, a total of 42 TLC images were collected in the ASE optimization experiment, while six TLC images were collected in the Soxhlet extraction experiment. In order to estimate the background component in the TLC image, each chromatographic plate was scanned in the same wavelength range in an area in which an extraction mixture was not present.

#### HPLC

The analyses using HPLC were performed with a Gynkotek liquid chromatograph (Macclesfield, UK) equipped with a Gynkotek Gina 50 autosampler, a Gynkotek P 580A LPG pump, a Gynkotek UVD 340U diode-array detector, and Chromeleon Dionex v. 6.4 software for data acquisition and processing. Separation was carried out on a 250 × 4.6 mm id, 5 µm particle size, RP18 column (Varian, Harbor City, CA; Cat. No. 1215-9307) for 10 µL sample aliquots.

In order to investigate the influence of temperature on the extraction yields of rosmarinic and caffeic acid, ASE extraction of the dried common thyme (*T. vulgaris* L.) samples that had been pretreated to partially remove lipids and chlorophyll was carried out at 130, 140, 150, 175, and 200°C. Prior to the HPLC analysis, all plant extracts were filtered through an Anotop<sup>TM</sup> 25 Plus syringe filter (0.02 µm; Whatman, Maidstone, Kent, UK). The analyses were carried out in the gradient elution mode using methanol–1% aqueous acetic acid mixtures. The gradient profile

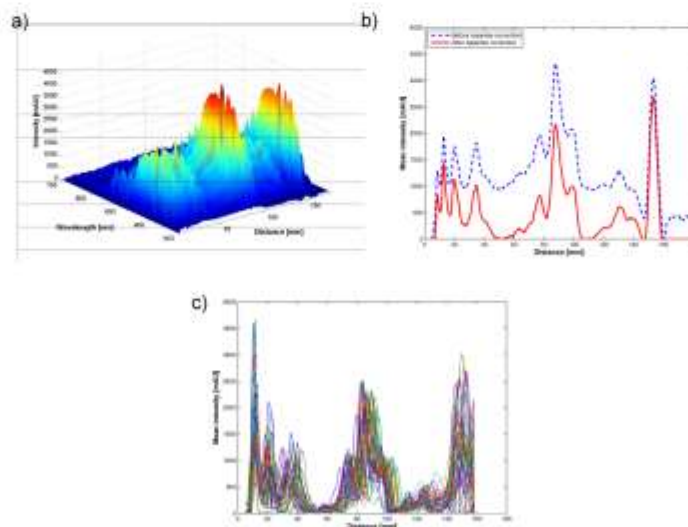


Figure 2. Data representations: (a) a background corrected TLC image for one sample, (b) mean densitogram prior to (dashed line) and after (solid line) the baseline correction; each mean densitogram was obtained by averaging the intensity over the wavelengths within the range of 320 to 520 nm, and (c) a total of 42 unaligned mean densitograms.



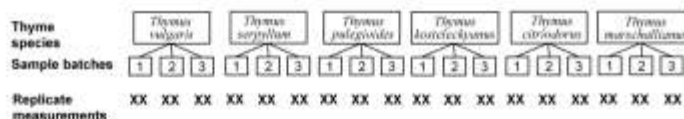


Figure 3. Scheme of the experimental design with two factors, i.e., thyme species and sample batches that are nested within the thyme species. Each 'x' represents one preprocessed mean densitogram.

is given in Figure 2. The mobile phase flow rate (0.5 mL/min) was constant, and the total analysis time was 55 min. Chromatograms were registered at 250 nm.

#### Methods of Data Preprocessing and Analysis

Optimal extraction conditions for ASE were determined using RSM (24). A CCD was adopted to investigate the effect of two factors—the methanol concentration and the extraction temperature—on the total phenolic content of the ASE extracts. This is usually the design of choice for fitting a second-order response surface. The second-order model for the coded variables can be expressed by the following equation:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \epsilon \quad (1)$$

where  $\beta_0$  is the offset;  $\beta_1$  and  $\beta_2$  are the linear regression coefficients;  $\beta_{11}$  and  $\beta_{22}$  are the quadratic regression coefficients;  $\beta_{12}$  is the interaction regression coefficient;  $x_1$  and  $x_2$  represent the methanol concentration and extraction temperature, respectively; and  $\epsilon$  is the error term. The response variable,  $y$ , represents the area under the mean densitograms that are obtained by averaging the intensities over the wavelengths. The area under each mean densitogram is related to the total phenolic content of a given extract. Estimation of the regression coefficients in Equation 1 is done using multiple linear regression. This is possible because the model is linear with respect to the  $\beta$ -parameters, no matter what the shape of the surface it describes is. The analysis of variance (ANOVA) with the type III sum of squares was used to check the significance of the regression coefficients. The model adequacy was tested using residual analysis, lack-of-fit evaluation, and estimation of the coefficient of determination and its adjusted value  $R^2$  and  $R^2_{adj}$ . The assumed level of significance was 0.05 ( $P$ -value  $< 0.05$ ).

As mentioned before, a single TLC image (wavelengths  $\times$  distances) was recorded for each Soxhlet and ASE sample because different phenolic compounds absorb at different wavelengths. In general, the instrumental signals often require preprocessing prior to further analysis. The processing procedure includes steps that are related to enhancement of the S/N, elimination of background, and alignment of corresponding peaks. The background was eliminated by subtracting the respective TLC background (that was scanned in the same wavelength range) from the TLC image of the sample. An example of a TLC image after background correction is presented in Figure 1a.

A mean densitogram was then obtained for each sample by averaging the intensities at each measurement point along the distance axis over the wavelengths within the range of 320 to 520 nm. Densitograms that were collected at the higher wavelengths were not considered due to the low intensities that were recorded. Assuming that the noise level is acceptably low, the baseline component often has a smooth, but nonlinear, shape over the signal's domain. For this reason, a flexible approach

that aids in estimating the shape of the baseline component is greatly desired. The penalized asymmetric least squares (PALS) approach (25) was used to estimate the baseline component of the obtained mean densitograms. Among the various different methods, PALS is preferred due to its simplicity and good performance. The PALS method relies on modeling the baseline component using an iterative approach that minimizes the cost function that includes the sum of the weighted squared differences between corresponding points in a signal and an approximated baseline and penalized squared differences of an assumed order for the approximated baseline. During an iterative procedure, the points of the baseline component that are found above the corresponding points of a signal receive very small weights, and the elements of the baseline component are updated to minimize the cost function. Such a weighting scheme permits the estimation of the signal baseline using only fragments in which there are no peaks:

$$Q = \sum_i w_i (s_i - b_i)^2 + \lambda (\Delta^d b_i)^2 \quad (2)$$

where  $s_i$  and  $b_i$  are consecutive points in a signal and approximated baseline, respectively;  $\lambda$  is a penalty parameter; and  $\Delta^d$  denotes differences of order  $d$ . In most settings, choosing  $d = 1$  or 2 leads to a good baseline approximation. The penalty parameter controls the level of smoothness of the approximated baseline.

The mean densitogram, which was obtained from the TLC image in Figure 1a, is shown in Figure 1b prior to (blue dashed line) and after (red solid line) the baseline correction. All of the preprocessed mean densitograms that were obtained in the ASE extraction experiment are presented in Figure 1c. Only after the correct preprocessing of the mean densitograms, can the area under each densitogram be calculated, e.g., using trapezoidal numerical integration with unit spacing, thus resulting in estimation of the total phenolic content of an extract that has been obtained by either the ASE or Soxhlet extraction.

Once the S/N of the individual mean densitograms is corrected, their alignment may be necessary. When experimental conditions cannot be strictly reproduced from sample to sample, the corresponding peaks among the densitograms are shifted. As a result, additional variation is introduced into the experimental data. Because this variability is not related to the underlying differences that are observed among the samples, it should be removed. Signal alignment techniques (26) are used to do that. In most methods, the positions of peaks in signals are corrected with respect to a selected representative signal, which is called a target. Since the position of corresponding peaks is a priori unknown, their shape is often used to guide the alignment of peaks by considering the correlation coefficient as a cost function. Therefore, the alignment increases the correlation coefficient that is observed between a signal that is being aligned and a target signal.

Many alignment techniques have been proposed in the literature. One of the most widely accepted is correlation optimized warping

(COW; 27). The COW method functions by using principles of warping, i.e., compressing and stretching signal sections. During this procedure, the target signal and the signal that is being aligned are divided into a number of sections that usually contain the same number of sampling points. With an exception of the first and the last sampling point of a signal, the remaining points that determine the sections are examined. This is controlled by the so-called slack parameter,  $t$ . When  $t = 1$ , three possible locations of the section end are considered, and therefore three section lengths are allowed: with one less point, an unchanged length, and with one more point with respect to the initial section. Then, all possible sections are linearly interpolated and compared with their counterparts that were found in the target signal, and their degree of match is scored using the correlation coefficient. The COW procedure relies upon finding the optimal positions of the section end points, so that after a section warping signal matches the target signal, the correlation coefficient is maximal. When the number of sections that is selected is reasonably large and the  $t$  parameter is properly optimized, a different degree of peak shifts can be successfully corrected.

A comparison of the thyme species can be done either with respect to the total phenolic content or by using mean densitograms as their fingerprints. From a chromatographic point of view, the latter strategy is more interesting than the former one, since it allows for the identification of an area (or areas) in the mean densitogram that can be related to the differences in the phenolic content of various species that are being analyzed. For this reason, methods such as ANOVA-principal component analysis (ANOVA-PCA; 28) and ANOVA-simultaneous component analysis (ANOVA-SCA; 29–32), which have gained much popularity in recent years, are highly valued.

The ANOVA-SCA methodology consists of selecting a model in accordance with the experimental design, evaluating the factor effects and their significance; and the application of a dimensionality reduction technique such as SCA or PCA for the interpretation and visualization of the factor effect data. The two-stage nested design presented in Figure 3 was considered for the comparison of the six species. The three ASE extracts (batches) collected for each of the species are further analyzed in duplicate. Sample batches are called to be nested within the species. Suppose that the preprocessed and warped mean densitograms for all of the species are organized in a matrix  $X$  of dimensions  $(I \times J)$ . Then, the nested ANOVA model for the  $j$ -th ( $j = 1, 2, \dots, J$ )

measurement point for the  $i$ -th ( $i = 1, 2, \dots, I$ ) sample at  $k$  levels (where  $k = 1, 2, \dots, K$  and  $l = 1, 2, \dots, L$ ) of the first factor (species) with effect  $\alpha_k$  and the second factor (sample batches) with effect  $\beta_l$ ,  $x_{kij}$  of  $X$  can be written as follows:

$$x_{kij} = \mu_j + \alpha_k + \beta_{klj} + \varepsilon_{kij} \quad (3)$$

where  $\mu_j$  is the mean value that is calculated for the  $j$ -th measurement point and  $\varepsilon_{kij}$  is the error term. The simple one-factor effect that explains the differences among the species is the most interesting in this study.

Contributions to the variation of all the  $I$  samples described by the  $J$  measurement points can be collected in the respective effect matrixes of dimensions  $I \times J$ , and this can be presented as:

$$X = M + X_\alpha + X_\beta + X_\varepsilon \quad (4)$$

In fact, the decomposition described by Equation 3 is applied to each measurement point, and each effect matrix in Equation 4 contains as many identical row vectors as there are levels in the respective factor. The mean matrix,  $M$ , is of rank one, and all the rows are identical and equal to the general column mean of  $X$ . After centering  $(X - M)$ , the row elements of  $X_\alpha$  are calculated as the column means of  $K$  groups. Similarly, the elements of the nested effect  $X_\beta$  are estimated after deflation. The column spaces of the effect matrixes are orthogonal to each other, and therefore the partition of the total sum of squares,  $SS_{\text{total}}$ , can be written in the following way:

$$SS_{\text{total}} = SS_M + SS_\alpha + SS_\beta + SS_\varepsilon \quad (5)$$

Significance testing of the individual effects is done using the permutation of the residuals under the reduced model as the best strategy when the assumption that the errors are normally distributed is not fulfilled (33), as is often the case in real multivariate chemical data. When the sum of the squares for the experimental data is lower than the sum of the squares for the permuted data for most of the cases, the null hypothesis for the tested effect is then accepted, because there are no significant differences among the group means. The level of significance ( $P$ -value) is calculated as the number of permutations in which the sum of squares is larger than the true experimental value of the sum of squares.

The last step of the ANOVA-SCA methodology is to visualize

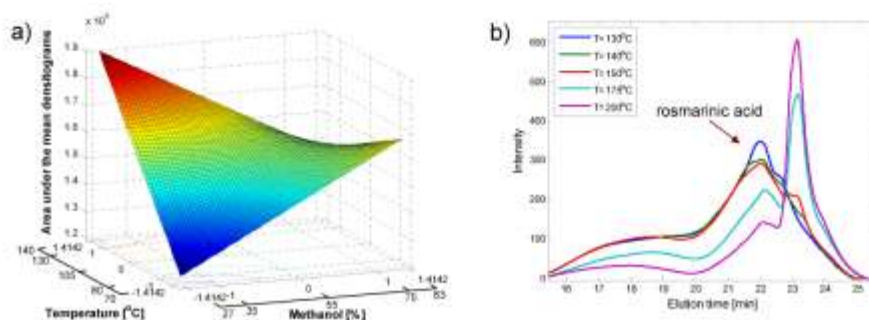


Figure 4. Results of the CCD: (a) response surface plot, results of the HPLC experiment and (b) chromatograms for the ASE extracts obtained at different extraction temperatures and the optimal concentration of methanol.

**Table 3. Results of ANOVA (type III sum of squares)**

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F-value	P-value
Model	$1.05 \times 10^{-12}$	2	$5.24 \times 10^{-11}$	1098.5	<0.0001
$x_1$ (methanol)	$1.80 \times 10^{-8}$	1	$1.80 \times 10^{-8}$	0.363	0.540
$x_2$ (temp.)	$2.22 \times 10^{-9}$	1	$2.22 \times 10^{-9}$	4.709	0.037
$x_1^2$	$6.59 \times 10^{-8}$	1	$6.59 \times 10^{-8}$	1.397	0.245
$x_2^2$	$2.94 \times 10^{-8}$	1	$2.94 \times 10^{-8}$	0.623	0.435
$x_1x_2$	$2.03 \times 10^{-9}$	1	$2.03 \times 10^{-9}$	4.303	0.045
Residuals	$1.95 \times 10^{-14}$	39	$4.77 \times 10^{-6}$		

and interpret the relationship among the measurement points by using a dimensionality reduction technique such as SCA for each effect matrix. The SCA submodel for the first effect matrix that explains the differences among the six species can be described in the following way:

$$X_n = T_n P_n^T + E_n \quad (6)$$

With the SCA, the first effect matrix is decomposed into two matrices: a scores matrix  $T_n$  of dimensions  $I \times f$  that is associated with the projections of samples in the space spanned by orthogonal components, and a weights matrix  $P_n^T$  that is associated with the projections of variables onto these  $f$  components. These new  $f$  components are a linear combination of the original variables and are obtained by maximizing the variance of the projected data. Matrix  $E_n$  contains the part of the variation that is not explained by the submodel. The rank of the  $X_n$  matrix is equal to the number of levels minus one ( $K-1$ ), and therefore it suggests the number of latent components in this submodel.

## Results and Discussion

The first step undertaken in this study was to establish the optimal ASE conditions and to validate the method, while the second step was to compare the ASE extracts that were obtained from six different thyme species under the optimal extraction conditions with respect to the total content of the phenolics present therein, or with respect to their mean densitograms.

### Optimization of the ASE Working Conditions

As mentioned above, the CCD with the experimental runs that are presented in Table 1 was used to select the extraction temperature and methanol concentration at which the ASE extracts had the highest amounts of phenolic compounds. The response surface plot is displayed in Figure 4a, and the results of the ANOVA using the type III sum of squares are shown in Table 3.

From the  $P$ -values that are presented in Table 3, one can conclude that the regression coefficients that are related to the effect of temperature,  $x_2$ , and to the interaction effect of methanol concentration and temperature,  $x_1x_2$ , are statistically significant ( $P$ -value <0.05). Thus, the interaction model that is described by the following equation:

$$y = 1.58 \cdot 10^1 + 0.08 \cdot 10^1 x_2 - 0.11 \cdot 10^1 x_1 x_2 + e \quad (7)$$

was found to be significant ( $P$ -value <0.0001) and adequate to

predict the total phenolic yield in the common thyme extracts. The lack-of-fit estimate was insignificant ( $P$ -value >0.05), and the  $R^2$  and  $R^2_{adj}$  were 0.9826 and 0.9817, respectively. The shape of the response surface (Figure 4a) shows that the optimal temperature for obtaining thyme extracts that are richest in phenolic compounds is the highest one considered in this experimental design, i.e., 140°C, while the methanol concentration was 27%. This is not a surprising observation, and it is in agreement with the research findings for the other Lamiaceae species, e.g., oregano (22). In general, high temperatures enhance the solubility of phenolic compounds, but in combination with the high pressure in ASE, which increases the stability of covalent bonds within molecules, thermal degradation of compounds is prevented. To investigate whether thermal degradation of some selected compounds such as rosmarinic acid occurs, an HPLC experiment was carried out for the thyme ASE extracts that were obtained at 130, 140, 150, 175, and 200°C and the optimal concentration of methanol. The recorded HPLC chromatograms are presented in Figure 4b. An increase of the extraction temperature above 130°C resulted in a decrease in the amount of rosmarinic acid, whereas the amount of caffeic acid increased. Chromatographic profiles suggest the conversion of rosmarinic acid to caffeic acid as the reason for its observed thermal degradation. Moreover, extracts prepared within a temperature range of 150 to 200°C may potentially contain harmful compounds as a result of the Maillard reaction, and therefore these temperatures are generally not recommended. Because the thermal degradation of rosmarinic acid was observed above 140°C in this study, the final optimal temperature was set at 130°C. This resulted in an insignificant decrease in the total phenolic content, which was estimated by the area under the mean densitograms. Thus, the final optimal ASE conditions were the temperature of 130°C and methanol concentration of 27%. The validation of the model showed a relative error of 5%, which is acceptable for this study type.

Compared with the phenolic yields that were obtained under optimal conditions in the Soxhlet apparatus, the ASE extracts under the optimal conditions were almost three times richer in phenolic compounds. That is why the ASE method was chosen to compare the phenolic content of the extracts from the different thyme species.

### Comparison of Six Different Thyme Species

A comparison of the six thyme species was done using mean densitograms (TLC fingerprints). For this purpose, background elimination followed by a baseline correction with the PALS approach was performed on the mean densitograms that were obtained similarly to the process in which the ASE conditions were optimized. The penalty parameter was set to 10000, and the order of differences was equal to two. A total of 36 mean densitograms, which are shown in Figure 5a, were obtained according to the experimental design described by Equation 3 and presented schematically in Figure 3.

After the baseline correction, the peaks of the densitograms that are presented in Figure 5a are shifted along the distance axis, which requires the application of a peak correction before any further data analysis. The alignment of the signals was performed using the COW algorithm described in the previous section. First, the target mean densitogram, i.e., the one with the largest mean value of the correlation coefficient with the remaining mean densitograms (26), was selected from all mean densitograms.

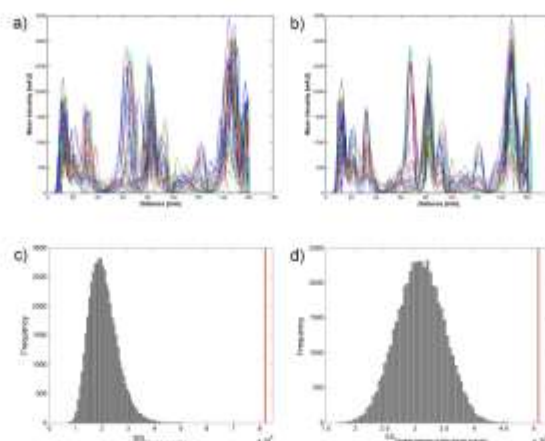


Figure 5. A comparison of the six thyme species: (a) a total of 36 unaligned mean densitograms; (b) all densitograms after baseline correction and warping, histograms constructed for 50 000 permutations for (c) the 'thyme species' effect; and (d) the 'sample batches within the thyme species' effect.

Then, the remaining signals were aligned with COW using a slack parameter of two and 10 sections. The final aligned mean densitograms are presented in Figure 5b.

A two-stage nested ANOVA design was used to test the effect of the species ( $K = 6$ ) and sample batches within each species. The significance of the effects was determined using permutation testing. The main idea of permutation testing is to compare the true sum of squares for an effect with the distribution of the sums of squares that are obtained from the data with a permuted order of samples. The null hypothesis, which is defined as the one for which the studied factor has no effect, is accepted when the sum of squares for the true data is smaller than the sum of squares for the permuted data for the majority of cases. Thus, there are no significant differences between the original group means that are defined for the studied effect and the means that are calculated after the random assignment of samples to these groups. The  $P$ -value is calculated as the ratio of the number of cases in which the sum of squares for the permuted data is larger than the sum of squares for the original data to the total number of permutations. The two histograms that were constructed for 50 000 permutations for the tested effects are presented in

Figures 5c and d. The two null hypotheses are defined as those for which there are no significant differences among the thyme species and among the sample batches within the species. The true sums of squares in both histograms are larger than the sums of squares for the permuted data, thus indicating that the null hypotheses can be rejected. In the other words, both effects are significant with  $P$ -values equal to  $1/50\,000$ . This means that the phenolic content in the thyme species differs from one species to another. Furthermore, it is interesting to investigate the (dis)similarities among the different species, as described by Equation 6, using SCA of the effect matrix  $X_{ij}$ . Since neither qualitative nor quantitative analysis was performed due to the low chromatographic resolution of the densitograms, an interpretation using definite phenolic composition is not possible, and the area of importance could only be emphasized. Determination of the specific compositions of phenolic compounds that were found in a given TLC spot would require an additional qualitative analysis.

The projection of species in the space that was spanned by the first two components and the respective relative contributions of variables are presented in Figures 6a and b. Two components of SCA of this submodel explain 70.52% of the total model

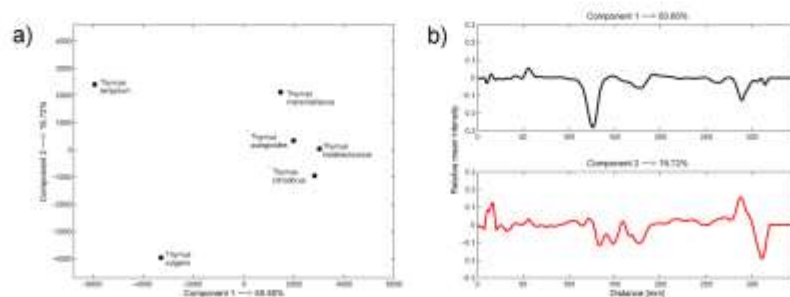


Figure 6. Simultaneous component analysis submodel for the 'thyme species' effect: (a) projections of species on the plane spanned by the first and second components and (b) projections of mean intensity measurement points on the first and second components.



variance. The first observation is that the phenolic content of the four species, i.e., *T. pulegioides*, *T. kosteleckyana*, *T. citriodorus*, and *T. marshalliana*, differs from those for *T. vulgaris* and *T. serpyllum*. Specifically, these differences are related to the differences in the concentrations of the phenolic compounds that are located at a distance of approximately 60–75 mm from the starting point. The second component is mainly associated with differences between *T. vulgaris* and the other species.

The two-stage ANOVA model was also applied using the information about the total phenolic content of the different species only. Once again, the effect related to these differences was statistically significant with a *P*-value of 0.0012 (*P*-value < 0.05).

## Conclusions

Methanol concentration of 27% and temperature of 130°C were found as optimal using CCD in order to obtain extracts of common thyme with the ASE method. The final optimal temperature was selected after conducting an HPLC experiment that showed thermal degradation of rosmarinic acid at temperatures higher than 140°C. Optimization of the ASE conditions resulted in a relative error of 5%.

The results of the comparative study of the extracts from the ASE and the Soxhlet apparatus showed that the total phenolic content of the ASE extracts is approximately three times higher than the total phenolic content of the extract that is obtained using the Soxhlet method. Furthermore, by applying a two-stage ANOVA model, it was found that the phenolic content of four species, i.e., *T. pulegioides*, *T. kosteleckyana*, *T. citriodorus*, and *T. marshalliana*, differs from the phenolic content of *T. vulgaris* and *T. serpyllum*.

## References

- Pedersen, J.A. (2000) *Biochem. Syst. Ecol.* **28**, 229–253. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00058-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00058-7)
- Nickavar B., & Esbati, N. (2012) *J. Acupunct. Meridian Stud.* **5**, 119–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jams.2012.03.003>
- Oh, S.Y., Ko, J.W., Jeong, S.-Y., & Hong, J. (2008) *J. Chromatogr. A* **1205**, 117–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.078>
- Bazylo, A., & Strzelecka, H. (2007) *Fitoterapia* **78**, 391–395. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.007>
- Hossain, M.A., Al-Ragmi, K.A.S., Al-Mijez, Z.H., Wel, A.M., & Al-Riyami, Q. (2013) *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**, 705–710. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60142-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60142-2)
- Lee, S.-J., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K.-G. (2005) *Food Chem.* **91**, 131–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.056>
- Jordan, M.J., Martinez, R.M., Martinez, C., Monino, I., & Sonamayor, J.A. (2009) *Ind. Crops Prod.* **29**, 145–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.021>
- Corticchiato, M., Bernardini, A., Costa, J., Bayet, C., Saunio, A., & Voina, B. (1995) *Phytochemistry* **40**, 115–120. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00217-U](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00217-U)
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., & Felinger, A. (2010) *J. Chromatogr. A* **1217**, 7972–7980. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.042>
- Meneses, N.G.T., Martins, S., Teixeira, J.A., & Mussato, S.I. (2013) *Sep. Purif. Technol.* **108**, 152–158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>
- Fecka, I., & Turek, S. (2008) *Food Chem.* **108**, 1039–1053. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.035>
- Parejo, I., Caprai, E., Bastida, B., Viladomat, F., Jiaogui, O., & Codina, C. (2004) *J. Ethnopharmacol.* **94**, 175–184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.017>
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentao, P., Andrade, P.B., Coelho, N., & Romano, A. (2012) *Food Chem.* **135**, 1253–1260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.072>
- Cerda, A., Martinez, M.E., Soto, C., Poirier, P., Pérez-Correa, J.R., Vergara-Salinas, J.R., & Zuniga, M.E. (2013) *Food Chem.* **139**, 138–143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.044>
- Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astrak, K., de los Mozos-Pascual, M., Taranitis, P., Herráiz-Penalver, D., & Santana-Méridas, O. (2013) *Ind. Crops Prod.* **49**, 150–159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.053>
- Bimkr, M., Abdul Rahman, R., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., & Zaidul, I.S.M. (2011) *Food Bioprocess. Process.* **89**, 67–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.002>
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011) *Anal. Chim. Acta* **703**, 8–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Ossipov, V., Nurmi, K., Loponen, J., Haukioja, E., & Pihlaja, K. (1996) *J. Chromatogr. A* **721**, 59–68. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00765-2](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(95)00765-2)
- Tanmali, A., Arráez-Román, D., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2012) *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1817–1825. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.090>
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Zhang, M., Gao, Y., Ma, C., & Wang, Z. (2010) *J. Chromatogr. A* **1217**, 2441–2446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.022>
- Plessi, M., Bertelli, D., & Miglietta, F. (2006) *J. Food Comp. Anal.* **19**, 49–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2004.10.008>
- Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., & Branton, N.P. (2011) *Food Chem.* **126**, 339–346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.076>
- Pothier, J., Galand, J., El Oualid, M., & Viel, C. (2001) *Il Farmaco* **56**, 505–511. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01085-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01085-0)
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., & Anderson-Cook, C.M. (2009) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ
- Eilers, P.H.C. (2004) *Anal. Chem.* **76**, 404–411. <http://dx.doi.org/10.1021/ac034800e>
- Daszykowski, M., & Walczak, B. (2007) *J. Chromatogr. A* **1176**, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.099>
- Nielsen, N.-P.V., Carstensen, J.M., & Smedsgaard, J. (1998) *J. Chromatogr. A* **805**, 17–35. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00021-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00021-1)
- Harrington, P.B., Vieira, N.E., Chen, P., Espinoza, J., Kae Nien, J., Romero, R., & Yergey, A. (2006) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **82**, 283–293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.05.011>
- Jansen, J.J., Hoefstoot, H.C.J., Van der Geert, J., Timmerman, M.E., Westerhuis, J.A., & Smilde, A.K. (2005) *J. Chemometr.* **19**, 469–481. <http://dx.doi.org/10.1002/cem.952>
- Smilde, A.K., Hoefstoot, H.C.J., & Westerhuis, J.A. (2008) *J. Chemometr.* **22**, 464–471. <http://dx.doi.org/10.1002/cem.1175>
- Stanimirova, L., Michalik, K., Drzaga, Z., Trzeciak, H., Wentzell, P.D., & Walczak, B. (2011) *Anal. Chim. Acta* **689**, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.008>
- Stanimirova, L., Kazura, M., de Beer, D., Joubert, E., Schulze, A.E., Beelders, T., de Villiers, A., & Walczak, B. (2013) *Talanta* **115**, 590–599. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.023>
- Anderson, M.J., & Ter Braak, C.J.F. (2003) *J. Statist. Comput. Simul.* **73**, 85–113. <http://dx.doi.org/10.1080/00949650215733>

## SPECIAL GUEST EDITOR SECTION

## A Comparison of Antibacterial Activity of Selected Thyme (*Thymus*) Species by Means of the Dot Blot Test with Direct Bioautographic Detection

MARTA ORLOWSKA, TERESA KOWALSKA, and MIECZYSLAW SAJEWICZ

University of Silesia, Institute of Chemistry, Department of General Chemistry and Chromatography, 9 Szkolna St, 40-006 Katowice, Poland

WIOLETA JESIONEK and IRENA M. CHOMA

University of Maria Curie-Skłodowska, Department of Chromatographic Methods, Lublin, Poland

BARBARA MAJER-DZIEDZIC

University of Life Sciences, Department of Veterinary Microbiology, Lublin Poland

GRAŻYNA SZYMCHAK

Maria Curie-Skłodowska University, Botanical Garden, 3 Sławinkowska St, 20-810 Lublin, Poland

MONIKA WAKSMUNDZKA-HAJNOS

Medical University of Lublin, Department of Inorganic Chemistry, 4 A, Chodźki St, 20-093 Lublin, Poland

Bioautography carried out with the aid of thin-layer chromatographic adsorbents can be used to assess antibacterial activity in samples of different origin. It can either be used as a simple and cost-effective detection method applied to a developed chromatogram, or to the dot blot test performed on a chromatographic plate, where total antibacterial activity of a sample is scrutinized. It was an aim of this study to compare antibacterial activity of 18 thyme (*Thymus*) specimens and species (originating from the same gardening plot and harvested in the same period of time) by means of a dot blot test with direct bioautography. A two-step extraction of herbal material was applied, and at step two the polar fraction of secondary metabolites was obtained under the earlier optimized extraction conditions [methanol–water (27 + 73, v/v), 130°C]. This fraction was then tested for its antibacterial activity against *Bacillus subtilis* bacteria. It was established that all investigated extracts exhibited antibacterial activity, yet distinct differences were perceived in the size of the bacterial growth inhibition zones among the compared thyme species. Based on the results obtained, *T. citriodorus* "golden dwarf" (sample No. 5) and *T. marschallianus* (sample No. 6) were selected as promising targets for further investigations and possible inclusion in a herbal pharmacopeia, which is an essential scientific novelty of this study.

of this genus is in Europe, North Africa, and Asia, and the thyme plants belong to the mint family (*Lat. Lamiaceae*, also known as *Labiatae*) as one of its approximately 350 genera. One of the most common representatives of the thyme genus is common thyme (*Thymus vulgaris* L.; 1, 2). Extensive phytochemical studies on the chemical composition of this particular plant allowed identification of several bioactive classes of constituents, such as phenolic acids, flavonoids, and essential oil components including terpenes and terpenoids (3). Owing to the richness of chemical components, common thyme exerts a wide spectrum of curative activities such as antiseptic, antioxidant, antibacterial, and spasmolytic (4, 5). It is well known that chemical composition of botanical material strongly depends on numerous external factors such as climatic conditions and the harvesting period. In the case of the thyme genus, considerable differentiation in chemical composition is a species-dependent additional factor (6, 7). Moreover, quantitative composition of any fraction derived from herbal material is affected by the working parameters of the extraction process. Duration and temperature of this process and selection of adequate extractants should be optimized in advance, in order to maximize final result (8).

TLC combined with biological and chemical detection is a well-performing and cost-effective analytical technique that allows an easy assessment of herbal extracts both in the small- and the large-scale chemical laboratories. Coupling TLC with biological detection carried out by means of direct bioautography (TLC-DB) establishes antibacterial, antifungal, enzymatic, or estrogenic activity of the plants and provides relatively rapid results (9–12). One interesting variant of this method is known as TLC-bioluminescence, where detection is carried out with aid of bioluminescent bacteria (12–14). DB based on microbiological detection is the most frequently applied bioautographic technique (10, 14–16). A developed chromatographic plate is first immersed in a suspension of microorganisms, followed by incubation at a proper temperature in a humid atmosphere. Microorganism growth takes place directly on the developed chromatogram, and the microbial growth inhibition zones are observed for those compounds (or compound fractions) that exert antibacterial activity. In

**T**hyme (*Thymus*) is the genus name of aromatic plants long recognized for their curative properties, with a growing role in gardening and economy. Natural habitat

Guest edited as a special report on "Assessment of Antioxidant and Antibacterial Potential of Medicinal Herbs and Botanical Preparations" by Teresa Kowalska and Lukasz Cieśla.

Corresponding author's e-mail: m.orlowska.us@gmail.com

DOI: 10.5740/jaoacint.SGE3-Orlowska

**Table 1.** The investigated *Thymus* specimens and species; location of the respective harvesting plots in the Botanical Garden of Maria Curie-Skłodowska University in Lublin, Poland; respective bacterial growth inhibition zones

No.	Thyme species	Location of harvesting plot	Inhibition zone ( $\pm$ SD), cm <sup>2</sup>
1	<i>T. vulgaris</i>	Commodity	0.35 ( $\pm$ 0.03)
2	<i>T. serpyllum</i>	Arboretum	0.88 ( $\pm$ 0.11)
3	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	Alpinarium	0.43 ( $\pm$ 0.02)
4	<i>T. kosterlekyanus</i>	Mediterranean	1.06 ( $\pm$ 0.11)
5	<i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' leaves	Systematic	1.44 ( $\pm$ 0.07)
6	<i>T. marschallianus</i>	Alpinarium	1.3 ( $\pm$ 0.07)
7	<i>T. degeni</i>	Mediterranean	0.38 ( $\pm$ 0.06)
8	<i>T. pseudolanuginosus</i>	Arboretum	0.99 ( $\pm$ 0.04)
9	<i>T. pannonicus</i>	Alpinarium	0.79 ( $\pm$ 0.03)
10	<i>T. austriacus</i>	Arboretum	0.89 ( $\pm$ 0.01)
11	<i>T. praecox</i> 'pygmaeus'	Alpinarium	0.96 ( $\pm$ 0.02)
12	<i>T. filifolius</i>	Commodity	0.99 ( $\pm$ 0.06)
13	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i>	Commodity	0.60 ( $\pm$ 0.02)
14	<i>T. citriodorus</i> 'golden dwarf' rhizome	Systematic	0.78 ( $\pm$ 0.06)
15	<i>T. serpyllum</i> 'aureus'	Arboretum	0.82 ( $\pm$ 0.01)
16	<i>T. serpyllum</i> 'albus'	Commodity	0.85 ( $\pm$ 0.03)
17	<i>T. serpyllum</i>	Systematic	0.84 ( $\pm$ 0.02)
18	<i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i>	Alpinarium	0.87 ( $\pm$ 0.05)

order to visualize inhibition zones, tetrazolium salt is most frequently applied, which under the influence of dehydrogenase originating from live microbial cells is transformed to purple formazan. As a result, cream-white inhibition zones appear on a purple background, resulting from the presence of antibacterial compounds in a given sample. Another technique is contact bioautography. Here, the developed chromatogram is placed for certain amount of time on the surface of an agar layer inoculated with bacteria to enable diffusion of the separated bands from the chromatogram to the agar. Then the chromatographic plate is removed, and the agar layer is incubated. Inhibition zones appear in places where chromatographic bands with antibacterial activity have come in contact with the agar layer. The third technique is known as immersion bioautography. In this case, the developed chromatogram is first immersed in (or coated with) melted agar inoculated with the test microorganisms, and then the chromatographic plate is incubated (15, 17, 18).

It was an aim of this study to scrutinize the antibacterial activity of 18 thyme specimens and species, and to point out the species that have the highest activity. These species were selected for further and more detailed investigations as promising targets for inclusion in a herbal pharmacopoeia. In our study, we applied the dot blot test with DB detection. Herbal extracts were applied spotwise to chromatographic plates, and the total antibacterial activity of these extracts was assessed without developing the respective chromatograms.

## Experimental

### Herbal Material and Its Processing

For our investigation, 18 thyme specimens and species (listed in Table 1) that originated from the Botanical Garden of Maria Curie-Skłodowska University in Lublin, Poland, were

selected. In all cases (except for samples No. 5 and 14), the whole plants were taken into consideration. With samples No. 5 and 14, leaves and rhizomes were investigated, respectively. Herbal material was harvested in July, 2012, and dried in a thermostatted drying chamber at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Dry herbs were ground and stored in a refrigerator until the commencement of the experiments. Acetone, methanol, and *n*-hexane (PPH POCH, Gliwice, Poland) used throughout the experiments were of analytical purity. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent was also of analytical purity (Sigma, St. Louis, MO). For preparation of extracts and solutions, water was double distilled and deionized under laboratory conditions using an Elix Advantage model Merck Millipore system (Molsheim, France). Antibacterial activity of plant extracts was tested against Gram-positive *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

### Extraction of Herbal Material

First, herbal material samples were weighed in the amounts of 5 g each, placed in paper cartridges in a Soxhlet apparatus, and macerated in *n*-hexane for 24 h. Then, in order to partially remove lipids and chlorophyll, an exhaustive extraction with *n*-hexane was continued for approximately 35 h, and the *n*-hexane extract was discarded. Removal of the ballast substances, chlorophyll in particular, was inevitable, even at an expense of the probable partial loss of the phenolics. Otherwise, an intense green color of chlorophyll would invalidate the ultimate quantitative result of bioautography, which is based on a color effect. In the next step, the dry raw material was again weighed (in amounts of 0.5 g for each repetition) and transferred to the cells of an accelerated solvent extraction (ASE) unit (the ASE 200 model, Dionex, Sunnyvale, CA). Extraction in the second step was carried out for three different samples of each thyme species

under the earlier optimized working conditions (19), i.e., 130°C with methanol–water (27 + 73, v/v) as the extracting medium. Extracts originating from ASE were stored in amber glass bottles in a refrigerator until the commencement of analyses.

#### Dot Blot Test with Bioautographic Detection

Prior to the commencement of bioautography, herbal extracts were filtered through Anotop<sup>TM</sup> 25 Plus cartridges (0.02 µm; Whatman, Maidstone, Kent, UK) as a sample preparation step. Then, 10 µL aliquots of the filtrates were applied spotwise with glass capillaries (CAMAG, Muttenz, Switzerland) to chromatographic plates precoated with silica gel Si 60 F<sub>254</sub> (10 × 20 cm; Merck, Darmstadt, Germany, Cat. No. 1.05729). We purposely avoided the TLC procedure and used the dot blot test instead for the following reasons: First, silica gel is an active chromatographic adsorbent with the weak cationic properties that in the course of a lengthy chromatographic procedure could negatively affect the constituents of the plant extract, lowering their antibacterial potential; and second, herbal medicines are well known for action synergism, which means that isolated components or component fractions can perform worse against the bacteria than the natural combination of constituents.

In the next step, the microbial suspension was prepared, which consisted of two stages, (i) preincubation and (ii) incubation. In stage (i), a bacterial colony was used that was collected from the *B. subtilis* culture (20). These bacteria produce endospores, so the preliminary incubation of bacteria at 37°C for 20 h was needed to finally obtain the logarithmic phase of bacterial growth. Then, for 1 h, preincubation at 37°C was continued in order to activate the bacteria. At stage (ii), the microbial suspension obtained from the preincubation [stage (i)] was diluted with prepared Mueller-Hinton broth (pH = 7.2 ± 0.2) in a volume proportion of 1:20, and it was incubated for 1 h at 37°C. Then 5 mL diluted suspension was added to 100 mL Mueller-Hinton broth and vortexed at 37°C for 6 h. The solution was additionally thickened with agarose (0.05%).

Once the incubation step was completed, the chromatographic plates were dipped in the microorganism suspension for 8 s with use of a TLC Immersion Device (CAMAG) and then incubated for 17 h at 37°C in a humid atmosphere in a closed chamber. The chromatographic plates were then sprayed with a 0.2% aqueous solution of MTT and incubated for 30 min at 37°C. After drying at ambient temperature in air, cream-white zones of the bacterial growth inhibition appeared on a purple background. These results of the dot blot test with DB detection were recorded with use of the digital Repostar camera (CAMAG), and surface areas of individual zones were planimetrically measured in cm<sup>2</sup> units (HAFF, Pfronten, Germany).

#### Results and Discussion

The results of the dot blot test with direct bioautographic detection demonstrate that all investigated extracts of the polar fraction derived with use of methanol–water (27 + 73, v/v) from 18 thyme (*Thymus* L.) specimens and species exhibited antibacterial activity. Numerical values of surface areas measured for the respective bacterial growth inhibition zones are given in Table 1.

Inspection of the numerical data given in Table 1, indicates that the mean surface areas of the bacterial growth inhibition

zones (calculated for  $n = 3$  repetitions) were in the range from 0.35 to 1.44 cm<sup>2</sup>. The two species with the highest antibacterial activity were *T. citriodorus* “golden dwarf” (sample No. 5, the lemon thyme leaves; inhibition zone, 1.44 cm<sup>2</sup>) and *T. marschallianus* (sample No. 6; inhibition zone, 1.30 cm<sup>2</sup>). The two species with the lowest antibacterial activity were *T. vulgaris* (sample No. 1; inhibition zone, 0.35 cm<sup>2</sup>) and *T. degenii* (sample No. 7; inhibition zone, 0.38 cm<sup>2</sup>). In Figure 1, graphical comparison of the antibacterial activity of all the investigated thyme species in percentage units is made, with the data obtained for *T. citriodorus* “golden dwarf”, characterized by the highest antibacterial activity, assumed equal to 100%. In Figure 2, photographs are given showing the results of bioautographic detection performed for the extracts obtained from selected thyme samples with the lowest, medium, and highest antibacterial activity.

From a literature survey, it was found that the dot blot test with DB detection has never before been applied to the evaluation of antibacterial activity of any thyme species. Moreover, to the best of our knowledge, no reports are available on antibacterial activity of polar extracts derived from *T. citriodorus* and *T. marschallianus*, which performed best in our dot blot test. Hence, we are unable to compare the results obtained in this study with those originating from other investigations.

However, the literature survey pointed out not only to the culinary uses but also the antioxidant and curative potential of *T. citriodorus* (21, 22) and the antioxidant and antibacterial potential of *T. marschallianus* (23), the two thyme species that in our antibacterial test performed the best. A recently published paper (21) is the first one that provides detailed qualitative and quantitative characteristics of the phenolics contained in the ethanol extract derived from *T. citriodorus* and concludes that this *Thymus* species can be used as a nutraceutical agent with potential interest for the food and pharmaceutical industries. The same authors (22) demonstrated antioxidant and at least equally important cytoprotective action of the ethanol extract derived from *T. citriodorus* upon human hepatoblastoma HepG2 cells in model conditions of chemical stress induced by potassium dichromate. The results of investigations on antioxidant and antibacterial activity of essential oil derived from *T. marschallianus* were reported (23), pointing to possible applicability of this product as a natural food preservative. Although essential oil derived from *T. marschallianus* does not contain the phenolics, information provided in this paper (23) suggests considerable antibacterial potential of *T. marschallianus* as a whole.

*T. vulgaris* and *T. degenii* are the two *Thymus* L. species that performed the worst in our antibacterial dot blot test. For an obvious reason, literature is available on antibacterial activity of common thyme (*T. vulgaris*) as the most popular *Thymus* genus representative, assessed both for essential oil derived from this species (e.g., 24, 25) and for the phenolic containing extracts (e.g., 26, 27). However, no analogous reports have been found referring to *T. degenii*, and this lack of information can be considered as an indirect indication of a low curative potential of this herb.

#### Conclusions

To our best knowledge, this is the first report on the assessment of antibacterial activity of the thyme (*Thymus*)



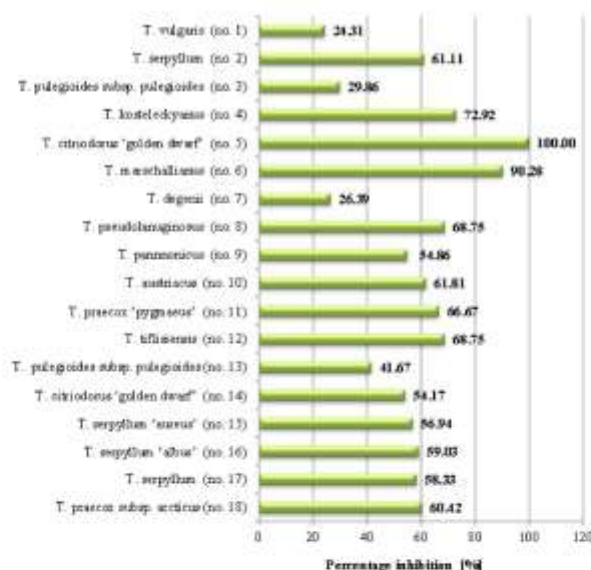


Figure 1. Graphical comparison of antibacterial activity of the investigated thyme (*Thymus*) specimens and species in terms of percentage inhibition calculated against *T. citriodorus* "golden dwarf" with the assumed 100% inhibition activity.

species with use of the dot blot test with DB detection. The conclusion originating from the presented analytical results is that *T. citriodorus* (leaves) and *T. marschallianus* (whole plant) exert remarkable antibacterial activity, considerably higher than that of the remaining scrutinized herbs. Thus, further and more detailed investigations of these two herbs are strongly recommended, with possible future applications in the food industry (as natural food preservatives) and the pharmaceutical industry (as antibacterial agents). In our view,

the possibility should be considered of including *T. citriodorus* and *T. marschallianus* in a herbal pharmacopoeia.

#### Acknowledgments

Author Marta Orłowska acknowledges the financial support of the DoktorIS project, co-financed by the European Union within the European Social Fund.

#### References

- (1) Oh, S.Y., Ko, J.W., Jeong, S.Y., & Hong, J. (2008) *J. Chromatogr. A* **1205**, 117–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.078>
- (2) Fecka, I., & Turek, S. (2008) *Food Chem.* **108**, 1039–1053. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.035>
- (3) Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borrás, X., Romero, M.P., & Motiula, M.J. (2012) *J. Chromatogr. B* **905**, 75–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.040>
- (4) Lee, S.J., Umuno, K., Shibamoto, T., & Lee, K.G. (2005) *Food Chem.* **91**, 131–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.056>
- (5) Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Káll, F., & Felinger, A. (2010) *J. Chromatogr. A* **1217**, 7972–7980. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.042>
- (6) Jordán, M.J., Martínez, R.M., Martínez, C., Molino, I., & Sotomayor, J.A. (2009) *Ind. Crop. Prod.* **29**, 145–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.021>
- (7) Corticchiato, M., Bernardini, A., Costa, J., Bayet, C., Saunio, A., & Voirin, B. (1995) *Phytochemistry* **40**, 115–120. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00217-U](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00217-U)
- (8) Costa, P., Gonçalves, S., Valente, P., Andrade, P.B., Coelho, N., & Romão, A. (2012) *Food Chem.* **135**, 1253–1260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.072>
- (9) Marston, A., Maillard, M., & Hostettmann, K. (1997) *GIT Lab. J.* **1**, 36–39

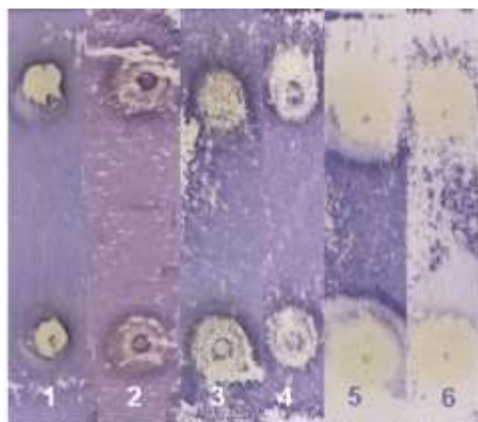


Figure 2. Photograph of the chromatographic plates showing the result of the dot blot test with DB detection for *T. vulgaris* (1) and *T. denizii* (2) with the lowest antibacterial activity; *T. serpyllum* "albus" (3) and *T. praecox* subsp. *arcticus* (4) with medium antibacterial activity; and *T. marschallianus* (5) and *T. citriodorus* "golden dwarf" (6) with highest antibacterial activity.

- (10) Marston, A. (2011) *J. Chromatogr. A* **1218**, 2676–2683. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.068>
- (11) Simões-Pires, C.A., Hmicha, B., Marston, A., & Hostettmann, K. (2009) *Phytochem. Anal.* **20**, 511–515. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.1154>
- (12) Weiss, Ch., & Jork, H. (1996) *J. Chromatogr. A* **750**, 403–407. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00601-2](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(96)00601-2)
- (13) Eberz, G., Rast, H.G., Burger, K., Kreiss, W., & Weisemann, C. (1996) *Chromatographia* **43**, 5–9. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02272814>
- (14) Móricz, Á.M., Tyihák, E., & Ott, P.G. (2010) *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* **23**, 180–183. <http://dx.doi.org/10.1556/JPC.23.2010.3.2>
- (15) Choma, I.M., & Grzelak, E.M. (2011) *J. Chromatogr. A* **1218**, 2684–2691. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>
- (16) Grzelak, E.M., Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I.M. (2013) *J. AOAC Int.* **96**, 1167–1174. <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.SGEGrzalak>
- (17) Schimoula, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., & Costa, S.S. (2005) *J. Ethnopharmacol.* **96**, 563–568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.007>
- (18) Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W., & Yan, X. (2005) *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 201–206. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-004-3318-6>
- (19) Orłowska, M., Stanimirova, I., Staszek, D., Waksmundzka-Hajnos, M., Sajewicz, M., & Kowalska, T. (2014) *J. AOAC Int.* **97**, 1–8. <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.SGEOrlowska>
- (20) Grzelak, E.M., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I.M. (2013) *J. AOAC Int.* **96**, 386–391. <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.11-466>
- (21) Pereira, O.R., Peres, A.M., Silva, A.M.S., Domingues, M.R.M., & Cardoso, S.M. (2013) *Food Res. Int.* **54**, 1773–1780. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.016>
- (22) Pereira, O.R., Macias, R.I.R., Perez, M.J., Marin, J.J.G., & Cardoso, S.M. (2013) *J. Funct. Foods* **5**, 1170–1179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.03.014>
- (23) Jia, H.L., Ji, Q.L., Xing, S.L., Zhang, P.H., Zhu, G.L., & Wang, X.H. (2010) *J. Food Sci.* **75**, E59–E65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01413.x>
- (24) Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (1999) *J. Food Prot.* **62**, 1017–1023
- (25) Nikolic, M., Glamoclija, J., Ferreira, L.C.F.R., Culbehla, R.C., Fernandes, A., Markovic, T., Markovic, D., Givelli, A., & Sokovic, M. (2014) *Ind. Crop. Prod.* **52**, 183–190. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.10.006
- (26) Zeghad, N., & Merghem, R. (2013) *Med. Aromat. Plant Res. J.* **1**, 5–11
- (27) Salih, S.S. (2012) *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* **3**, 147–150

## SPECIAL GUEST EDITOR SECTION

## Antioxidant Activity of Selected Thyme (*Thymus* L.) Species and Study of the Equivalence of Different Measuring Methodologies

MARTA ORLOWSKA, TERESA KOWALSKA, and MIECZYSLAW SAJEWICZ

University of Silesia, Institute of Chemistry, Department of General Chemistry and Chromatography, 9 Szkolna St, 40-006 Katowice, Poland

KATARZYNA PYTLAKOWSKA

University of Silesia, Institute of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, 9 Szkolna St, 40-006 Katowice, Poland

MARIOLA BARTOSZEK and JUSTYNA POLAK

University of Silesia, Institute of Chemistry, Department of Materials Chemistry and Chemical Technology, 9 Szkolna St, 40-006 Katowice, Poland

MONIKA WAKSMUNDZKA-HAJNOS

Medical University of Lublin, Department of Inorganic Chemistry, 4 A, Chodźki St, 20-093 Lublin, Poland

This study presents the results of comparative evaluation of the antioxidant activity of the phenolic fraction exhaustively extracted with aqueous methanol from 18 different thyme (*Thymus* L.) specimens and species. This evaluation is made with use of the same free radical source (DPPH<sup>•</sup> radical), three different free radical scavenging models (gallic acid, ascorbic acid, and Trolox), and three different measuring techniques (the dot blot test, UV-Vis spectrophotometry, and electron paramagnetic resonance spectroscopy, EPR). A comparison of the equivalence of these three different measuring techniques (performed with use of hierarchical clustering with Euclidean distance as a similarity measure and Ward's linkage) is particularly important in view of the fact that different laboratories use different antioxidant activity measuring techniques, which makes any interlaboratory comparison hardly possible. The results obtained confirm a semiquantitative equivalence among the three compared methodologies, and a proposal is made of a simple and cost-effective dot blot test that uses the DPPH<sup>•</sup> radical and provides differentiation of antioxidant activity of herbal matter comparable with the results of the UV-Vis spectrophotometry and EPR.

All *Thymus* L. species are the aromatic plants that are often used as herbal teas, condiments, and folk medicines. The origin of the *Thymus* genus is assumed to lie in South Europe, showing two different centers, i.e., the Iberian Peninsula (together with North West Africa) and the Balkan Peninsula.

High variability in shape and form of the *Thymus* genus has always confronted taxonomists with a hard problem of dividing this genus into clearly defined species and caused an often unjustified increase in the declared species numbers (1). *Thymus* is an important genus, due to the presence of high contents of carvacrol and thymol, the phenolic terpene isomers, in its essential oils. However, there are also thyme species that are characterized by very low contents of the phenolics. In our earlier paper (2), we have drawn a similar conclusion regarding those *Thymus* species that are ubiquitous in Poland. The phenolic-rich *Thymus* species are used in curing diabetes, for stomach and intestinal diseases, for cough as herbal teas, and also as condiments, whereas those *Thymus* species that contain low amounts of phenolics are used in the areas of their natural habitat as herbal teas, due to the plants' pleasant aroma.

Important constituents of the *Thymus* species, apart from the volatile oil components, are phenolic acids, flavonoids, phenyl-propane derivatives, and tannins (3). Several phenolic acids (i.e., caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, and rosmarinic acid) and flavonoids (i.e., naringenin, luteolin, and apigenin) have often been identified in the *Thymus* species, with increased concentrations of some of these compounds after hydrolysis (3, 4).

Thyme volatile oil is strongly antiseptic. Its main constituents, in particular thymol, are very effective antifungals. This oil is also an expectorant; it expels worms and exerts a tonic effect, in that way supporting the body's normal functioning and counteracting the effects of ageing. Thymol, methyl chavicol, and flavonoids present in the thyme species are known for relieving muscle spasms (3, 5).

Antioxidants are compounds that deactivate free radicals. In living organisms, enzymatic and nonenzymatic antioxidants are present. Among the most important nonenzymatic antioxidants are vitamins A, C, and E;  $\beta$ -carotene; selenium; and flavonoids. Certain compounds present in such culinary spices as thyme, rosemary, cinnamon, or black pepper are good sources of antioxidants. For the determination of antioxidant activity, a selection of methods are applied that make use of such reagents, as 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), 2,2'-azino-bis(3-

Guest edited as a special report on "Assessment of Antioxidant and Antibacterial Potential of Medicinal Herbs and Botanical Preparations" by Teresa Kowalska and Lukasz Ciesla.

Corresponding author's e-mail: m.orlowska.us@gmail.com

DOI: 10.5740/jaoacint.SGE6-Orlowska

ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, or fluorescence recovery after bleaching (6, 7).

In paper by Roby et al. (4), the total phenol contents, composition of the phenolic fraction, as well as an antioxidant activity thereof were compared for thyme, sage, and marjoram. The methanol extracts of thyme demonstrated the highest levels of the phenolic compounds among the three compared herbs. The highest free radical scavenging activity of the thyme extracts, as proved with use of the UV spectrophotometry, was related to the highest contents of the total phenolics. It is noteworthy that the results of the study (4) showed that the thyme extracts exhibited the highest antioxidant capacity, followed by sage, and then marjoram.

High quantities of the phenolics contained in the thyme species (as reported by other researchers) gave us incentive for the present study, focusing on a comparison of the different thyme species with respect of their antioxidant activity and investigation of the equivalence of the different measuring methodologies. Apart from the two established methodologies [electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and UV-Vis spectrophotometry], we scrutinized a simple dot blot test, carried out with use of chromatographic plates, as a possible cost-effective alternative to the expensive instrumental techniques. This comparison of the equivalence of the measuring methodologies is particularly important in view of the fact that different phytochemical laboratories make use of different antioxidant activity measuring techniques, which makes an interlaboratory comparison (both in terms of quantitative results and the method performance) hardly possible.

## Experimental

### Herbal Material and Its Processing

Herbal material investigated in this study originated from Botanical Garden of the Maria-Curie University, Lublin, Poland. 18 specimens and species of thyme (*Thymus* L.) were collected in July, 2012, and dried in a thermostatted drying chamber at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Next, the dry plant material was ground and stored in a refrigerator until the commencement of analyses. A list of the thyme species investigated in this study is given in Table 1.

At an initial stage, an exhaustive extraction of the plant material was carried out in a Soxhlet apparatus with use of *n*-hexane in order to remove lipids and at least certain amounts of chlorophyll as ballast constituents. Then the preprocessed plant material was dried for 24 h and after that time from each thyme species a 0.5 g sample was weighed out. An accelerated solvent extraction (ASE) with use of a Model 200 ASE apparatus (Dionex, Sunnyvale, CA) was carried out under the optimum working conditions [extraction temperature,  $130^\circ\text{C}$ ; methanol–water (27 + 73, v/v)] established earlier (8). For each plant species, the ASE procedure was performed in triplicate. As a result, from each extraction 37 mL extract was obtained for each individual thyme species. Extracts were kept in amber glass vessels and stored in a refrigerator until the analytical steps.

### Reagents

DPPH<sup>•</sup> (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland) was used as a source of free radicals in each analytical technique used in

this study. As organic solvents, acetone, acetic acid, methanol, ethanol and *n*-hexane of analytical purity grade (P.O.Ch., Gliwice, Poland) were used. For the preparation of herbal extracts and other solutions, we used high purity water obtained from a Milli-Q water purification system (Merck Millipore, Molsheim, France).

For spectrophotometric analyses, ascorbic acid (AA) and gallic acid (GA) of analytical purity (P.O.Ch.) were used. AA and GA were used as antioxidant standards. Their respective stock solutions were prepared using water double distilled and deionized in laboratory conditions by means of an Elix Advantage model Merck Millipore system. Working standards of AA and GA were prepared on an everyday basis by dilution of the stock solution with water. For the dot blot test, a water solution of GA was also used as an antioxidant standard.

For EPR spectroscopy, a standard solution of the water-soluble derivative of vitamin E, called Trolox (CAS No. 53188-07-1, Acros Organics, Geel, Belgium), was prepared as a quantitative measure of the antioxidant activity of the phenolics contained in the thyme extracts.

### Apparatus

Densitometric scanning of chromatographic plates in the dot blot test was performed with use of a CD 60 model scanning densitometer (Desaga, Wiesloch, Germany) equipped with Windows-compatible ProQuant software. Scanning was performed at 545 nm in the absorption mode.

Spectrophotometric measurements were performed with use of a V-530 model UV-Vis spectrophotometer (Jasco,

**Table 1.** List of the investigated thyme species and location of the harvesting plot within the Botanical Garden of the Maria-Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland

No.	Thyme species	Location of harvesting plot
1	<i>T. vulgaris</i> leaves	Commodity
2	<i>T. serpyllum</i> leaves	Arboretum
3	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i> leaves	Alpinarium
4	<i>T. kosteleckyianus</i> leaves	Mediterranean
5	<i>T. citriodorus</i> "golden dwarf" leaves	Systematic
6	<i>T. marschallianus</i> leaves	Alpinarium
7	<i>T. degenii</i> leaves	Mediterranean
8	<i>T. pseudolanuginosus</i> leaves	Arboretum
9	<i>T. pannonicus</i> leaves	Alpinarium
10	<i>T. austriacus</i> leaves	Arboretum
11	<i>T. praecox</i> "pygmaeus" leaves	Alpinarium
12	<i>T. liliifolius</i> leaves	Commodity
13	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i> leaves	Commodity
14	<i>T. citriodorus</i> "golden dwarf" rhizome	Systematic
15	<i>T. serpyllum</i> "aureus" leaves	Arboretum
16	<i>T. serpyllum</i> "albus" leaves	Commodity
17	<i>T. serpyllum</i> leaves	Systematic
18	<i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i> leaves	Alpinarium

Tokyo, Japan). The 1 cm glass cells were used for absorbance measurements in the visible light range.

EPR spectroscopic measurements were performed with use of a Bruker EMX EPR spectrometer (Bruker-Biospin, Rheinstetten, Germany). The EPR spectra were registered for each sample at typical working parameters, i.e., central field, 3480 G; modulation amplitude, 2.0 G; time constant, 40.96; and microwave power, 20.12 mW. The Gunn-diode source operating at 9.7 GHz (ER 041 XG Microwave-Bridge X-Band) was used to generate microwaves. A sample was loaded into a capillary with an id of 0.8 mm to a depth of 35 mm. Then, the capillary was placed in the EPR tube, 5 mm in diameter, located in the double resonator at the same depth. The variable temperature unit (BVT 3000) was used to maintain a constant temperature of  $297 \pm 0.5^\circ\text{K}$  during the measurements.

#### Dot Blot Assessment of Antioxidant Activity of Thyme Extracts

In order to assess total antioxidant properties of the obtained thyme extracts, the dot blot test was performed based on the reduction of the DPPH<sup>•</sup> radical by these extracts. In the dot blot test, a carefully chosen aliquot (1  $\mu\text{L}$ ) of each thyme extract was applied with a glass capillary to a chromatographic plate precoated with microcrystalline cellulose (20  $\times$  20 cm, Merck, Darmstadt, Germany; Cat. No. 1.05716), without developing of a chromatogram. First, the thyme extracts obtained from 18 plant specimens and species (according to the procedure described in the *Herbal Material and Its Processing* section) were filtered through an Anotop<sup>TM</sup> 25 Plus syringe filter (0.02  $\mu\text{m}$ ; Whatman, Maidstone, Kent, UK) and then applied spotwise to the chromatographic plates. Distance between two neighboring spots was 2.5 cm. After drying, the spots were visualized by spraying them with the 0.03% methanolic DPPH<sup>•</sup> solution. Plates sprayed with this solution were left for 30 min in order to reach reaction equilibrium between the antioxidant components of the extract and DPPH<sup>•</sup>. Then, the plates were scanned with use of the densitometer. As a reference compound for the assessment of the antioxidant properties of the thyme extracts, GA was selected, for which the dot blot test was also performed. The GA solution in water was applied to the chromatographic plate in aliquots from  $0.1 \times 10^{-3}$  to  $0.8 \times 10^{-3}$  mg/spot in  $0.1 \times 10^{-3}$  mg/spot intervals, and the spots were visualized with the DPPH<sup>•</sup> solution in methanol. On the basis of the obtained results, the calibration curve was calculated as  $y = 281310x + 121.29$  ( $r^2 = 0.993$ ), which describes the dependence between the concentration profile height,  $y$ , of the GA spot (in mAV) and the contents of GA,  $x$  (in mg). This equation allowed referring the antioxidant activity of the individual thyme species to that of GA. Each measurement described in this section was performed in triplicate, and the arithmetic mean values were used for further comparisons and discussion. The obtained results were recalculated for mg GA equivalent/1 g dry herbal matter, and they are presented in Table 2 together with quantitative results derived from the other analytical techniques.

#### UV-Vis Spectrophotometric Assessment of Antioxidant Activity of Thyme Extracts

For the study of antioxidant activity of the thyme extracts and the standard solutions of AA and GA, the DPPH<sup>•</sup> solution was diluted with methanol to obtain an absorbance of  $0.700 \pm 0.020$  at 515 nm. The 0.3% methanolic DPPH<sup>•</sup> stock solution was prepared and then stored under refrigeration until the commencement of the measurements. One hour before the measurements, the stock solution was placed in darkness at room temperature and then part of it was diluted to obtain a 0.003% solution. For sample analysis, an exact thyme extract volume was used to obtain an inhibition percentage between 20 and 80%, in the course of the 40 min long reaction carried out at room temperature in the darkness with an addition of 3.9 mL DPPH<sup>•</sup> solution.

The analytical procedure was as follows: To each glass test tube, 3.9 mL DPPH<sup>•</sup> solution was added. To one of these test tubes, 100  $\mu\text{L}$  methanol was added, which represented a control sample. To the remaining test tubes, different aliquots of the thyme extracts were added, and the total reaction volume was made up to 4 mL with methanol. These liquid mixtures were left for 40 min at room temperature in the darkness, prior to the measurement of absorbance at 515 nm. All measurements were performed in triplicate, and the data presented in this study are the averaged results from three independent measurements. AA and GA were used as positive controls. The percentage of inhibition of the DPPH<sup>•</sup> radical was calculated, using the following equation:

$$\text{Inhibition, \%} = \frac{\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}} \times 100 \quad (1)$$

where  $\text{Abs}_{\text{DPPH}}$  denotes the initial absorbance of the diluted DPPH<sup>•</sup> and  $\text{Abs}_{\text{sample}}$  denotes the absorbance of the investigated sample after the 40 min reaction (9). The results obtained for the thyme extracts were expressed as the AA and GA equivalents, using the appropriate calibration curves. For AA, the calibration curve was equal to

$$\text{Inhibition, \%} = 11424x - 1.49 \quad (r^2 = 0.9991)$$

and for GA it was equal to

$$\text{Inhibition, \%} = 34381x + 0.87 \quad (r^2 = 0.9990)$$

where  $x$  equals to the content of AA or GA (in mg), respectively. Finally, the obtained results were recalculated for mg AA or mg GA equivalent/1 g dry herbal matter and they are presented in Table 2.

#### EPR Spectroscopic Assessment of Antioxidant Activity of Thyme Extracts

In the case of EPR spectroscopy, antioxidant activity was assessed using an earlier described method. The regression equation for the linear relationship between the percentage inhibition of the EPR signal intensity and the mol number of Trolox was equal to

$$y = 987.60x + 16.36 \quad (r^2 = 0.98)$$

where  $y$  is the inhibition percentage and  $x$  is the volume of the

**Table 2.** The results of quantification of the antioxidant activity of 18 thyme specimens and species (see Table 1) as established by means of EPR spectroscopy, UV-Vis spectrophotometry, and the dot blot test

No.	EPR spectroscopy	UV-Vis spectrophotometry		Dot blot test
	mg TEAC/1 g dry herbal matter (RSD, %)	mg AA/1 g dry herbal matter (RSD, %)	mg GA/1 g dry herbal matter (RSD, %)	mg GA/1 g dry herbal matter (RSD, %)
1	85.60 (1.79)	28.33 (1.99)	8.77 (2.16)	25.97 (10.13)
2	74.13 (5.61)	24.73 (3.35)	7.56 (3.68)	32.54 (12.13)
3	133.00 (2.50)	39.25 (3.32)	12.44 (3.52)	45.26 (3.47)
4	77.07 (2.08)	27.62 (1.61)	8.53 (1.75)	44.38 (2.96)
5	33.61 (9.67)	17.68 (5.61)	5.19 (6.49)	25.53 (3.33)
6	74.54 (6.41)	19.85 (3.51)	5.92 (3.22)	30.79 (6.53)
7	106.55 (2.59)	29.15 (2.45)	9.05 (2.65)	41.75 (7.49)
8	97.88 (2.85)	30.47 (3.68)	9.49 (2.80)	33.88 (10.28)
9	99.43 (2.75)	24.87 (5.23)	7.81 (5.83)	38.49 (3.60)
10	94.47 (2.85)	22.18 (3.66)	6.71 (3.62)	37.36 (4.60)
11	58.53 (2.53)	17.04 (6.34)	4.98 (7.30)	20.70 (12.70)
12	88.31 (0.75)	24.09 (3.58)	7.35 (3.95)	38.05 (3.04)
13	74.47 (2.07)	27.99 (3.85)	8.66 (4.17)	29.47 (13.63)
14	56.61 (3.68)	12.24 (8.56)	3.37 (8.15)	11.94 (13.17)
15	133.38 (1.03)	38.93 (7.03)	12.33 (5.13)	49.64 (5.30)
16	137.53 (3.15)	48.03 (2.85)	15.39 (2.99)	60.16 (7.57)
17	77.75 (6.30)	22.59 (3.56)	6.84 (3.94)	31.23 (9.99)
18	74.78 (1.03)	18.79 (2.86)	5.57 (3.30)	35.17 (3.74)

sample in mL. This equation was used to calculate the antioxidant activity of the studied samples in  $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ mL}$  studied thyme extracts.

The intensity of the EPR spectrum decreases with an increasing concentration of Trolox, which results in an increase of the percentage inhibition (I, %). The percentage inhibition of the EPR spectrum was calculated using the following equation:

$$I, \% = [(I_0 - I)/I_0] \times 100 \quad (2)$$

where  $I_0$  is the integrated area under the EPR spectrum of DPPH $^{\bullet}$  (control sample), and  $I$  is the integrated area under the EPR spectrum of a mixture of DPPH $^{\bullet}$  and the thyme extract.

A typical reaction mixture contained 1 mL 200  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  DPPH $^{\bullet}$  solution in ethanol with from 0.001 to 0.052 mL thyme extract, depending on its manifested antioxidant properties. For all samples, the linear regression equations between the percentage inhibition (I, %) of the EPR signal intensity and the volume of the thyme extract sample (V) were determined. Based on this equation, the I, % corresponding to 100 mL studied extract was calculated. Then, from the standard curve obtained for Trolox, the antioxidant activity was first given in  $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ mL}$  thyme extract, and finally recalculated for mg Trolox equivalent (TEAC)/1 g dry herbal matter (see Table 2). Data presented in this study are the averaged results from three independent measurements.

## Results and Discussion

DPPH $^{\bullet}$  as a stable organic radical is commonly used for quantification of the radical-scavenging capacity of plant

extracts. In contact with the compounds exerting antioxidant properties, reduction of the colored DPPH $^{\bullet}$  radical occurs, and its extent depends on the type and concentration of the antioxidant species and the reaction time. Visually, this process is perceived as a change of the DPPH $^{\bullet}$  solution color from purple to yellow. In this study, the three approaches to the assessment and comparison of the antioxidant activity of the thyme extracts (i.e., the dot blot test, UV-Vis spectrophotometry, and EPR spectroscopy) were based on quantitative consumption of DPPH $^{\bullet}$  in the course of the redox reaction between DPPH $^{\bullet}$  and the plant extract components.

### Dot Blot Test Applied to Assessment of Antioxidant Activity of Thyme Extracts

Purely qualitative analysis of the dot blot test done at the beginning showed that all investigated thyme samples exerted antioxidant activity. An example of the visualized chromatographic plate showing an outcome of the dot blot test is given in Figure 1. In quantitative terms, antioxidant activity of individual thyme samples recalculated to GA was in the range from 11.94 to 60.16 mg GA/1 g dry herbal matter (Table 2). The highest antioxidant activity was established for extracts No. 16 and 15 (equivalent to 60.16 and 49.64 mg GA, respectively, 1 g dry herbal matter), and the lowest for extracts No. 11 and 14 (equivalent to 20.70 and 11.94 mg GA/1 g dry herbal matter, respectively). As none of the antioxidant activity quantification methods reported in the literature for thyme species were based on the dot blot test alone and, moreover, as the majority of the DPPH $^{\bullet}$  radical based tests use UV-Vis spectrophotometry,



there was no possibility to discuss the dot blot results obtained in this study in the context of those originating from earlier reports. The dot blot test based on the DPPH<sup>•</sup> radical for herbal extracts (thyme extracts included) was reported (10) as a purely qualitative approach. An attempt was made to use the dot blot test as an easy and fast approach to compare the total free radical scavenging capacity of different foodstuffs (thyme extract was not included; 11). However, without selecting any compound as a free radical scavenging reference or model, that approach has remained practically qualitative as well.

#### UV-Vis Spectrophotometric Assessment of Antioxidant Activity of Thyme Extracts

Spectrophotometric quantification of the radical-scavenging effect exerted by the thyme species was carried out at 515 nm. It was calculated from the AA and GA calibration curves and expressed as the AA and GA equivalents. In Table 2, a comparison of the antioxidant activity of the investigated thyme species is given, as established by means of the DPPH<sup>•</sup> test. It is noteworthy that quantitative results obtained with use of AA and GA (see Table 2) allowed arrangement of the investigated thyme extracts in two fully analogous sequences of similarly changing antioxidant properties, without even a single change of the plant order. The obtained numerical data show the highest scavenging activity can be attributed to extracts 16, 15, and 3, and the lowest to extracts No. 11 and 14.

It would certainly be nice to compare the results obtained for the different thyme species in this study with those available from the literature. Obviously, the yields of compounds with antioxidant properties strongly depend on numerous factors, such as, the plant species, the geographical and climatic zone, and the harvesting period, yet one would be satisfied comparing the magnitude orders at least. In fact, reports on the assessment of antioxidant properties of thyme extracts are very abundant in the literature, focusing either on a specific thyme species (e.g., 12–14), or on a selection of different medicinal and/or culinary herbs, thyme included (e.g., 15–17). However, quantification methodologies used by different authors are considerably different, and since antioxidant activities are measured as a global property of a given plant extract, a comparison of our results with those available from the literature would only be possible if a UV-Vis spectrophotometric method, the DPPH<sup>•</sup> test, and either GA or AA as a reference compound in the other studies were also used. Then the quantification outcome could be expressed in GA or AA equivalents/unit weight of the dry herbal matter, which in our view is a very simple and straightforward approach. Unfortunately, from a broad overview of the literature reports, it is evident that so far, it is not possible to find a common denominator enabling even a semiquantitative comparison of antioxidant properties of medicinal plants, which is a significant drawback in more than one aspect. First, it is impossible to compare quantitative results originating from different laboratories, and, as a further consequence, it is not possible to compare different methodologies in terms of their performance.

#### EPR Spectroscopic Assessment of Antioxidant Activity of Thyme Extracts

The decrease of intensity of the EPR signal of DPPH<sup>•</sup> after



Figure 1. An exemplary chromatographic plate showing an outcome of the dot blot test. Yellow spots represent the thyme extract samples visualized with DPPH<sup>•</sup> on purple background originating from unreacted DPPH<sup>•</sup>.

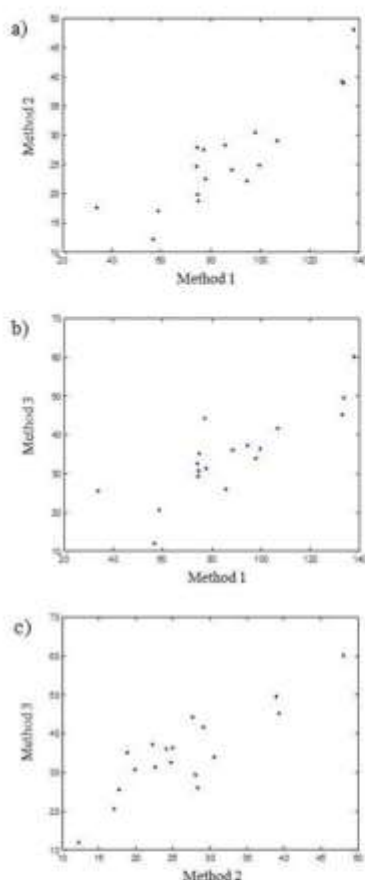
adding thyme extracts exhibiting antioxidant properties is illustrated in Figure 2. With a volume increase of the added sample (Figure 2 shows this effect in extracts of thyme species Nos. 5 and 16), the intensity of the signal decreases. For each sample of thyme extract, the EPR spectra were recorded after adding different volumes of the sample to DPPH<sup>•</sup>.

All the investigated thyme extracts exhibited antioxidant properties. The TEAC values determined by EPR spectroscopy were in the range from 33.61 to 137.53 mg Trolox/g dry herbal matter (Table 2). The highest TEAC values among all the examined thyme extracts were recorded for extracts No. 16, 15, and 3, and the lowest TEAC value was obtained for extract No. 5. However, it was not possible to compare the TEAC values obtained for the thyme samples in this study with the data originating from the literature, because to our best knowledge no EPR spectroscopy studies using DPPH<sup>•</sup> as a free radical standard have ever been performed for the thyme species.

#### Antioxidant Activity of Selected Thyme Species and a Comparison of Equivalence of Numerical Data Obtained with Use of the Three Different Measuring Techniques

In order to compare the antioxidant activity of the 18 investigated thyme extracts based on three different types of measurements (the dot blot test, EPR spectroscopy, and UV-Vis spectrophotometry), hierarchical clustering (with Euclidean distance as a similarity measure and Ward's linkage) was applied, and the results are presented in Figure 3.

From the dendrogram shown in Figure 3, it is seen that the 18 investigated thyme species can be grouped into the three main clusters: A, B, and C. Cluster C includes extracts No. 3, 15, and 16. Cluster B includes extracts No. 5, 11, and 14, whereas the remaining 12 thyme extracts belong to cluster A, which can further be subdivided into clusters A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>. Antioxidant activity of the three thyme extracts from cluster C most significantly differ from that of the remaining studied species. The augmented heat map shows that these three species are characterized by the highest antioxidant activity. It is noteworthy that two out of these three samples (i.e., extracts



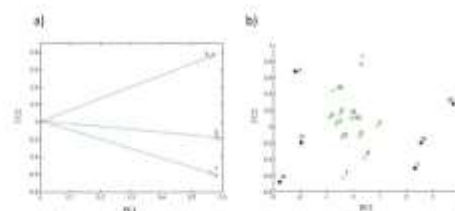
**Figure 4.** Relationship between the antioxidant properties of the studied thyme species measured by the three methods: (a) method 1 (EPR spectroscopy) versus method 2 (UV-Vis spectrophotometry); (b) method 1 (EPR spectroscopy) versus method 3 (the dot blot test), and (c) method 2 (UV-Vis spectrophotometry) versus method 3 (the dot blot test).

irrespective of the applied measurement technique. In the other words, the equivalence of the three different approaches compared in this study was convincingly confirmed.

It can be concluded that the simplest dot blot test provides quantitative results fully comparable with those of the instrumental measuring techniques, and, therefore, it can be recommended for fast and cost-effective screening of herbal antioxidant properties as a reliable replacement.

#### Acknowledgments

Author Marta Orłowska acknowledges the financial support of the DoktorIS project, co-financed by the European Union within the European Social Fund.



**Figure 5.** Results of PCA: (a) Projection of parameters (three compared methods of evaluation of antioxidant properties: EPR spectroscopy (1), UV-Vis spectrophotometry (2), and the dot blot test (3), and (b) projection of the 18 thyme species studied (Table 1) on the plane defined by PC1 and PC2.

#### References

- (1) Tümen, G., Kirimer, N., & Baser, K.H.C. (1995) *Chem. Nat. Comp.* **31**, 42–47. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01167569>
- (2) Staszek, D., Orłowska, M., Rzepa, J., Wróbel, M.S., Kowalska, T., Szymczak, G., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2014) *J. AOAC Int.* **97**, 1250–1258. <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.SGESStaszek>
- (3) Mărculescu, A., Vlase, L., Hanganu, D., Drăgulescu, C., Antonie, L., & Neli-Kinga, O. (2007) *Proc. Rom. Acad.* **3**, 117–121
- (4) Handy Roby, M.H., Sarhan, M.A., Abdel-Hamed Selim, K., & Khaleel, K.I. (2013) *Ind. Crops Prod.* **43**, 827–831. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>
- (5) Nickavar, B., Mojab, F., & Dolat-Abadi, R. (2005) *Food Chem.* **90**, 609–611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.020>
- (6) Czajka, A. (2006) *Niemcy Lekarskie* **75**, 582–586
- (7) Musa, K.H., Abdullah, A., Kuswandi, B., & Hidayat, M.A. (2013) *Food Chem.* **141**, 4102–4106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.112>
- (8) Orłowska, M., Stanimirova, I., Staszek, D., Sajewicz, M., Kowalska, T., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2014) *J. AOAC Int.* **97**, 1274–1281. <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.SGEOrłowska>
- (9) Deng, J., Cheng, W., & Yang, G. (2011) *Food Chem.* **125**, 1430–1435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.031>
- (10) Awah, F.M., Offor, N.N., Ndunaka, A.C., Okafor, F.U., & Enyabine, C.O. (2012) *J. Pharm. Res.* **5**, 2994–2998
- (11) Soler-Rivas, C., Espin, J.C., & Wichers, H.J. (2000) *Phytochem. Anal.* **11**, 330–338. [http://dx.doi.org/10.1002/1099-1565\(200009/10\)11:53.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/1099-1565(200009/10)11:53.0.CO;2-G)
- (12) Delgado, T., Marinero, P., Asensio-S.-Manzanera, M.C., Asensio, C., Herrero, B., Pereira, J.A., & Ramalhosa, E. (2014) *Food Sci. Technol.* **57**, 412–418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.041>
- (13) Sagdic, O., Ozkan, G., Aksoy, A., & Yetim, H. (2009) *J. Sci. Food Agric.* **89**, 791–795. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3513>
- (14) Pourmohamad, F., Enteshari, S., & Sariri, R. (2011) *Pharmacologyonline* **1**, 851–860
- (15) Cosio, M.S., Buratti, S., Mannino, S., & Benedetti, S. (2006) *Food Chem.* **97**, 725–731. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.043>
- (16) Amarowicz, R., Żegarska, Z., Rafalowski, R., Pegg, R.B., Karamac, M., & Kosinska, A. (2009) *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111**, 1111–1117. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200800170>
- (17) El Babili, F., Babili, M.E.L., Souhard, J.-P., & Chatelain, C. (2013) *Pharm. Crops* **4**, 15–20. <http://dx.doi.org/10.2174/2210290601304010015>



## A Comparison of Antioxidant, Antibacterial, and Anticancer Activity of the Selected Thyme Species by Means of Hierarchical Clustering and Principal Component Analysis

M. ORŁOWSKA<sup>1</sup>, K. PYTLAKOWSKA<sup>1</sup>, A. MROZEK-WILCZKIEWICZ<sup>2</sup>,  
R. MUSIOŁ<sup>1</sup>, M. WAKSMUNDZKA-HAJNOS<sup>3</sup>, M. SAJEWICZ<sup>1</sup>, AND  
T. KOWALSKA<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>University of Silesia, Institute of Chemistry, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

<sup>2</sup>Institute of Physics, University of Silesia, 75 Pułku Piechoty 1A Street, 41-500 Chorzów, Poland

<sup>3</sup>Medical University of Lublin, Department of Inorganic Chemistry, 4A Chodźki Street, 20-093  
Lublin, Poland

\*E-mail: teresa.kowalska@us.edu.pl

**Summary.** In this study, six numerical data sets are presented valid for eighteen thyme (*Thymus* L.) species and characterizing three biological properties of these herbs, i.e., antioxidant, antibacterial, and anticancer activity. Four data sets characterize antioxidant properties, one data set characterizes antibacterial property, and one data set characterizes anticancer activity. Antioxidant properties were measured with two free radical standards (DPPH and ABTS), two free radical scavenger standards (trolox and gallic acid), and three analytical techniques (EPR spectroscopy, ultraviolet-visible [UV-vis] spectrophotometry, and the dot blot test with bioautographic detection). Antibacterial activity was tested upon the Gram-positive *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) strain, and anticancer activity was evaluated upon the human colon adenocarcinoma cells (HCT116). It was found out that the thyme extracts characterize with all three biological activities (yet with anticancer activity not very strongly pronounced) and that in quantitative terms, each activity strongly depends on the thyme species considered. An ultimate goal of this study was to investigate if any quantitatively confirmed correlation exists among these three biological activities, which might point out to a common mechanism of their action. To this effect, six sets of numerical data underwent hierarchical clustering and Principal Component Analysis. Based on the results obtained, no quantitative correlation was established among antioxidant, antibacterial, and anticancer activity of the thyme species, which seems indicative of different molecular mechanisms of these three actions.

**Key Words:** thyme genus, antioxidant activity, antibacterial activity, anticancer activity, hierarchical clustering, principal component analysis

## Introduction

Bioactive substances present in plant material are able to improve health condition and to positively affect human organism. The most important

plant constituents include natural antioxidants, which are indispensable in combating free radicals [1]. In alimentary industry, an important role is played by synthetic antioxidants, such as butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT), or *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ), basically due to their good performance and higher cost-effectiveness, when compared with naturally occurring antioxidants. However, the results of numerous investigations point out to the fact that the safe usage of synthetic antioxidants can occasionally be questionable, and these findings instigate continuous efforts focusing on the search for natural antioxidants [2–4]. Plants belonging to such families, as Lamiaceae, Compositea, or Asteraceae, are recognized as particularly promising sources of natural antioxidants. Good examples of the antioxidant-rich species from the mint (Lamiaceae) family are common thyme (*Thymus vulgaris* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), or marjoram (*Origanum majorana* L.) [5, 6].

The most popular methods of determination of antioxidant properties of plants are those based on (1) scavenging of stable free radicals, such as DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), and (2) reduction of metal ions from the higher to the lower oxidation state (FRAP) with antioxidant plant constituents [7]. As it comes out from numerous researches, antioxidant properties of the different thyme species considerably vary depending on the species and the determination method applied [8, 9].

Coupling of thin-layer chromatography with biological detection known as direct bioautography (TLC-DB) enables rapid and convenient search for biologically active components in herbal material [10]. This method allows tracing bacterial growth directly on chromatographic plates [11]. The TLC approach can also be simplified and instead of determination of the chromatographically separated fractions, antibacterial activity of a sample can be measured as a whole, and then the method becomes the dot blot test with bioautographic detection [12, 13]. Antibacterial activity of essential oil derived from *T. caramanicus* was confirmed by Nejad et al. [14], and that of the aqueous and alcoholic extracts of *T. vulgaris* was approved using two types of pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [15]. The volatile fraction (essential oils) and the nonvolatile fraction (phenolics) derived from the selected thyme species were shown to exert strong antibacterial properties [16, 17]. Antibacterial and anticancer activity of the phenolics-rich thyme extracts was demonstrated in Ref. [18].

Certain results show that the spices-rich diets can counteract a risk of stomach or colon cancer [19]. Thymol as the main constituent of essential oils derived from most thyme species characterizes with numerous biological activities, one of them being anticancer activity [20]. Moreover, it was demonstrated that the thyme honey considerably hampers vitality of the

prostate cancer cells [21]. On the other hand, the reports on antiproliferative activity of thyme are really scarce and in view of high variability of chemical constituents in the thyme species, they have to be treated with an understandable reservation.

The aim of this study was to make a comparison of antioxidant, antibacterial, and anticancer activity of the extracts derived from 18 thyme species with use of hierarchical clustering and principal component analysis, and in the first instance to establish if any correlation exists among these three activity types. Some analytical data used for this comparison originate from our earlier research, and the other ones (i.e., antioxidant activity determined with use of ABTS as a free radical model and anticancer activity) are published for the first time.

## Experimental

### Herbal Material and Its Processing

Herbal material used in this study belongs to the mint (Lamiaceae) family and in *Table 1*, eighteen thyme species are listed, which were examined for their antioxidant, antibacterial, and anticancer activity. All these species originate from Botanical Garden of Maria Curie-Skłodowska University (Lublin, Poland), and they were harvested in July, 2012. All herbs were dried under adequate conditions, then grinded and stored under refrigeration until the commencement of analytical procedures.

Firstly, working conditions of running the extraction process were optimized upon a practical example of common thyme (*Thymus vulgaris* L.), as discussed in detail in Ref. [22]. Then, the dried raw material originating from 18 thyme species was extracted with use of the 200 model Dionex Accelerated Solvent Extractor (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Extraction was carried out using the optimized parameters of solvent quantitative composition and temperature, which were methanol–water, 27:73 (v/v) and 130 °C, respectively. For each individual thyme species, the extraction was performed in triplicate. Extracts were stored in amber glass bottles under refrigeration until the commencement of analytical procedure [22].

### Antioxidant Activity

Antioxidant activity was determined with use of two stable free radicals, i.e., DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid).

Table I. List of the investigated thyme species and location of the harvesting plot within the Botanical Garden of the Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland

No.	Thyme species	Location of harvesting plot
1	<i>T. vulgaris</i> leaves	Commodity
2	<i>T. serpyllum</i> leaves	Arboretum
3	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i> leaves	Alpinarium
4	<i>T. kosteleckyanus</i> leaves	Mediterranean
5	<i>T. citriodorus</i> "golden dwarf" leaves	Systematic
6	<i>T. marschallianus</i> leaves	Alpinarium
7	<i>T. degenii</i> leaves	Mediterranean
8	<i>T. pseudolanuginosus</i> leaves	Arboretum
9	<i>T. pannonicus</i> leaves	Alpinarium
10	<i>T. austriacus</i> leaves	Arboretum
11	<i>T. praecox</i> "pygmaeus" leaves	Alpinarium
12	<i>T. tiflisiensis</i> leaves	Commodity
13	<i>T. pulegioides</i> subsp. <i>pulegioides</i> leaves	Commodity
14	<i>T. citriodorus</i> "golden dwarf" rhizome	Systematic
15	<i>T. serpyllum</i> "aureus" leaves	Arboretum
16	<i>T. serpyllum</i> "albus" leaves	Commodity
17	<i>T. serpyllum</i> leaves	Systematic
18	<i>T. praecox</i> subsp. <i>arcticus</i> leaves	Alpinarium

DPPH as a source of free radicals was employed in combination with three analytical methods, i.e., the electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), the UV-vis spectrophotometry, and the dot blot test with bioautographic detection, as discussed in detail in Ref. [23]. For each individual method, respective calibration curve was determined, which allowed presentation of final results in form of mg standard compound per 1 g dried herbal material. In the case of EPR, trolox (the vitamin E derivative) was used as a standard free radical scavenger and the respective calibration curve was given by the equation  $y = 987.60x + 16.36$  ( $r^2 = 0.98$ ). In the case of the UV-vis spectrophotometry and the dot blot test with bioautographic detection, gallic acid (GA) was used as a standard free radical scavenger and the respective calibration curves were given by the equations  $y = 34381x + 0.87$  ( $r^2 = 0.999$ ) and  $y = 281310x + 121.29$  ( $r^2 = 0.993$ ), respectively [23].

ABTS as a source of free radicals was employed in combination with one analytical method only, i.e., the UV-vis spectrophotometry. As the results of this study have not been published earlier, here, the procedure is described in detail. Similar to the two earlier cases, gallic acid was used as the standard free radical scavenger. Prior to the analysis, the ABTS solution was prepared by its codissolving with ammonium persulfate in the mol dm<sup>-3</sup> proportion of  $7 \times 10^{-3}$ : $2.54 \times 10^{-3}$ , and the entity was left for 16 h at ambient temperature in the darkness. After that time, solution was diluted to obtain the needed absorbance ( $0.7 \pm 0.02$ ) at the wavelength of 734 nm. Then, the antioxidant properties of the thyme extracts were measured with use of the V-530 model spectrophotometer (Jasco, Japan). The reaction mixture contained 50  $\mu$ L thyme extract and 5 mL ABTS solution. The absorbance was measured at the wavelength of 740 nm after 10 min from preparation of the reaction mixture, and the measurements were performed for each extract in triplicate. The results were presented in form of mg gallic acid per 1 g dried herbal material. Percent inhibition was calculated from the below equation:

$$\text{Inhibition [\%]} = \frac{\text{Abs}_{\text{ABTS}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{ABTS}}} \times 100 \quad (1)$$

where  $\text{Abs}_{\text{ABTS}}$  denotes the absorbance of the ABTS solution and  $\text{Abs}_{\text{sample}}$  denotes the absorbance of the sample solution after 10 min storage time. The results obtained for the individual thyme extracts were recalculated for gallic acid with use of the calibration curve given by the equation  $y = 6644.9x + 1.62$  ( $r^2 = 0.999$ ), where  $y$  holds for the percent inhibition, and  $x$  holds for the amount of GA (in mg).

### Antibacterial Activity

Detailed report on measurements of antibacterial activity (which were performed for the thyme extracts with use of the dot blot test with bioautographic detection) is given in Ref. [17], and now, we highlight the main steps of the applied procedure. The 10  $\mu\text{L}$  aliquots of the thyme extracts were spotted on to the chromatographic plates precoated with silica gel.

Table II. Numerical results of antioxidant, anticancer, and antibacterial activity measurements (and the respective RSD [%] values) for the eighteen investigated thyme species

No.	Antioxidant activity				Anticancer activity	Antibacterial activity
	EPR	UV-vis		"Dot blot" test	HCT-116 (5)	DB-TLC (6)
	DPPH (1)	DPPH (2)	ABTS (3)	DPPH (4)		
	mg TEAC/1 g dry herbal matter (RSD [%])	mg GA/1 g dry herbal matter (RSD [%])	mg GA/1 g dry herbal matter (RSD [%])	mg GA/1 g dry herbal matter (RSD [%])	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (RSD [%])	Inhibition zone ( $\text{cm}^2$ ) (RSD [%])
1	85.60 (1.79)	8.77 (2.16)	14.13 (1.23)	25.97 (10.13)	1900 (4.62)	0.35 (9.43)
2	74.13 (5.61)	7.56 (3.68)	15.21 (2.03)	32.54 (12.13)	1400 (8.14)	0.88 (12.67)
3	133.00 (2.50)	12.44 (3.52)	18.02 (0.58)	45.26 (3.47)	715 (1.71)	0.43 (5.70)
4	77.07 (2.08)	8.53 (1.75)	16.68 (0.61)	44.38 (2.96)	650 (3.03)	1.05 (10.61)
5	33.61 (9.67)	5.19 (6.49)	12.86 (1.62)	25.53 (3.33)	1700 (8.29)	1.44 (4.58)
6	74.54 (6.41)	5.92 (3.22)	16.30 (1.17)	30.79 (6.53)	800 (0.89)	1.30 (5.58)
7	106.55 (2.59)	9.05 (2.65)	17.32 (1.63)	41.75 (7.49)	445 (11.32)	0.38 (14.63)
8	97.88 (2.86)	9.49 (2.80)	18.27 (0.16)	33.86 (10.28)	420 (4.43)	0.99 (4.23)
9	99.43 (2.76)	7.61 (5.83)	17.80 (1.06)	36.49 (3.60)	1700 (0.26)	0.79 (3.58)
10	94.47 (2.86)	6.71 (3.62)	16.95 (0.30)	37.36 (4.60)	1000 (0.63)	0.89 (1.59)
11	58.53 (2.53)	4.98 (7.30)	14.94 (2.75)	20.70 (12.70)	425 (3.23)	0.96 (1.96)
12	88.31 (0.75)	7.35 (3.95)	18.00 (1.09)	36.05 (3.04)	410 (0.13)	0.99 (5.95)
13	74.47 (2.07)	8.66 (4.17)	17.63 (1.00)	29.47 (13.63)	370 (0.13)	0.60 (4.08)
14	56.61 (3.68)	3.37 (8.15)	14.53 (5.20)	11.94 (13.17)	420 (2.53)	0.78 (7.13)
15	133.38 (1.03)	12.33 (5.13)	19.81 (0.84)	49.64 (5.30)	1225 (3.61)	0.82 (1.72)
16	137.53 (3.15)	15.39 (2.99)	19.04 (0.49)	60.16 (7.57)	340 (1.64)	0.85 (3.88)
17	77.75 (6.30)	6.84 (3.94)	17.10 (1.78)	31.23 (9.99)	385 (17.4)	0.84 (2.24)
18	74.78 (1.03)	5.57 (3.30)	15.99 (1.85)	35.17 (3.74)	530 (1.90)	0.87 (6.11)

The Gram-positive *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) in a specially prepared suspension was used as the test bacterium. Chromatographic plates with the spots of the thyme extracts were immersed for the period of 8 s in this suspension and then incubated at 37 °C in humid atmosphere for 17 h. Once incubation was finished, the plates were sprayed with the tetrazolium dye (MTT), incubated at 37 °C for 30 min, and then dried in ambient air. On the dried plates, the cream-white zones on a purple background appeared which showed the areas of the bacterial growth inhibition. The photographs of these plates were taken, and the surfaces of the inhibition zones were planimetrically measured (in cm<sup>2</sup>). The results obtained are given in numerical form in *Table II*.

### **Anticancer Activity**

An ambiguity encountered in the literature regarding anticancer activity of the thyme species made us interested in filling the gap by investigating a variety of the thyme species. As a cancer model, human colon cancer cells HCT-116 were selected as representative enough for an interaction with dietary constituents [24, 25].

#### **Cell culture**

The human colon adenocarcinoma cells (HCT116) were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were grown as monolayer cultures in 75 cm<sup>3</sup> flasks (Nunc) in Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12). This medium was supplemented with 12% heat inactivated fetal bovine serum (PAA), and for NHDF, with 15% fetal bovine serum (Gibco) and 100 µg mL<sup>-1</sup> gentamycin (Gibco). The cell lines were maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.

#### **Cytotoxicity assay**

Herbal extracts were lyophilized and dissolved in water, and further diluted in the medium to achieve necessary concentrations. The exponentially growing cells were harvested by trypsinization of the subconfluent cultures. Cells were seeded at the concentrations  $5.0 \times 10^3$  cells per well into the 96-well cell culture microtiter plates (Nunc) and cultured for 18 h. After this time, the growth medium was exchanged for the medium containing of the extracts in the concentration range from 0.1 to 2 mg mL<sup>-1</sup>. The cells were incubated with the extracts for 72 h. After that time, the medium was replaced with 100 µL DMEM without phenol red. Metabolic activity of viable cells



was determined by adding 20  $\mu$ L CellTiter 96®AQueousOne Solutions – MTS (Promega) to each well, followed by incubating for 1 h. The MTS assay is a colorimetric method used for determination of the number of viable cells. Standard solution containing 100  $\mu$ L DMEM without phenol red and 20  $\mu$ L MTS solution was used to determine “blank” absorbance. The absorbance was measured at 490 nm using Synergy™ 4 microplate reader (BioTek). The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the extract concentration able to reduce the cells proliferation to 50% of the untreated control cells. Each individual thyme extract was tested in triplicate in a single experiment, with each experiment being repeated 3 to 5 times.

## Results and Discussion

### Optimization of the ASE Working Conditions

Working conditions of the accelerated solvent extraction (ASE) were optimized with use of the response surface methodology (RSM) and benefiting from the central composite design (CCD). Detailed description of the performed optimization is presented in Ref. [22]. It was established that the optimal extraction temperature was 130 °C and the optimal proportion of the methanol–water extraction mixture was 27:73 (v/v) [22].

### Antioxidant Activity

Antioxidant activity of the thyme species was scrutinized with use of DPPH and ABTS as the two free radical standards. Data obtained with use of DPPH and three different analytical techniques (EPR spectroscopy, UV-vis spectrophotometry, and the “dot blot” test with bioautographic detection) were earlier discussed in Ref. [23], and now, they are summarized in Table II.

Results obtained with use of EPR point out to *T. serpyllum* “aureus” arboretum and *T. serpyllum* “albus” commodity as the two species with the most distinct antioxidant properties, and to *T. citriodorus* “golden dwarf” leaves systematic and *T. citriodorus* “golden dwarf” rhizome systematic as the two least potent antioxidants. Results originating from UV-vis spectrophotometry point out to *T. pulegioides* subsp. *pulegioides* alpinarium and *T. serpyllum* “albus” commodity as the two most potent and to *T. citriodorus* “golden dwarf” rhizome systematic and *T. praecox* “pygmaeus” alpinarium as the two least potent antioxidants. Results obtained with use of the dot blot test with bioautographic detection allow a statement that the extracts



derived from *T. serpyllum* "aureus" arboretum and *T. serpyllum* "albus" commodity are the two most potent antioxidants and those derived from *T. praecox* "pygmaeus" alpinarium and *T. citriodorus* "golden dwarf" rhizome systematic are the two least potent ones (Table II).

Data obtained with use of ABTS as the free radical standard and gallic acid as the free radical scavenger standard fall within the scope from 12.86 to 19.81 mg gallic acid per 1 g dried herbal matter and show similarity with the results obtained with use of DPPH. Thus, *T. serpyllum* "aureus" arboretum and *T. serpyllum* "albus" commodity show the most pronounced antioxidant activity (19.81 and 19.04 mg GA per 1 g dried herbs, respectively), and these results remain in agreement with those obtained with use of EPR. On the other hand, *T. citriodorus* "golden dwarf" leaves systematic and *T. vulgaris* commodity show the least pronounced antioxidant activity (12.86 and 14.13 mg GA per 1 g dried herbs, respectively). The analogous result for *T. citriodorus* "golden dwarf" leaves systematic was obtained with use of EPR. Numerical data valid for all thyme species are collected in Table II.

### Antibacterial Activity

The results of antibacterial activity obtained with use of the dot blot test with bioautographic detection were first presented in our earlier study [17]. Based on these results, it was established that the extracts from all investigated thyme species exert antibacterial activity. Detailed numerical results are given in Table II. The highest antibacterial activity can be attributed to *T. citriodorus* "golden dwarf" leaves systematic and *T. marschallianus* alpinarium, whereas *T. vulgaris* commodity and *T. degenii* mediterranean characterize with the lowest antibacterial activity.

### Anticancer Activity

All plant extracts were tested for their anticancer activity against human colon cancer cells using the MTS colorimetric assay. The results are presented in Table II. Individual anticancer activities are relatively low and do not exceed  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , although very strong variability between different species can be noticed. The most effective *T. serpyllum* "albus" inhibited cancer proliferation at  $340 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The *T. vulgaris* extract appeared to be the least potent anticancer agent with MIC reaching  $1900 \mu\text{g mL}^{-1}$ , with the MIC value 5 times higher than that for *T. serpyllum* "albus." Especially interesting difference could be observed in the case of the leaves and rhizomes of *T. citriodorus* "golden dwarf." Anticancer activity of rhizomes is roughly 4 times

higher than that of the leaves. Similarly, different *T. serpyllum* species show striking difference in their activity. The "aureus" variety is three times less effective in the anticancer assay than the "albus" variety.

### Comparison of Antioxidant, Antibacterial, and Anticancer Potential of the Selected *Thymus* Species by Means of Hierarchical Clustering and Principal Components Analysis

The aim of this study was to compare antioxidant, antibacterial, and anti-tumor potential of the extracts derived from 18 thyme (*Thymus*) species (listed in Table I) and, even more importantly, to find out whether any correlation exists among these three different biological activities, assessed with use of six different analytical methods. Method nos. 1–4 were used to assess antioxidant potential, method no. 5 was used to assess anticancer potential, and method no. 6 was used to evaluate antibacterial potential of the investigated thyme extracts (the method nos. are given in Table II). Statistical analysis was performed with use of hierarchical clustering (with Euclidian distance as a similarity measure and Ward's linkage) and principal components analysis.

#### Hierarchical Clustering

Firstly, the numerical data sets originating from all analyses performed (Table II) underwent hierarchical clustering and were arranged according to the degrees of correlation with use of the Ward's linkage method (Fig. 1) [26]. Hierarchical clustering revealed four main clusters, A, B, C, and D, with the thyme species nos. 4, 6, 8, 10, 12, 13, 17, and 18 belonging to cluster A; those nos. 1, 2, and 9 belonging to cluster B; those nos. 5, 11, and 14 belonging to cluster C; and those nos. 3, 7, 15, and 16 belonging to cluster D. The hierarchical clustering results were augmented with the heat map which emphasized interesting dependences among the extracts grouped in each cluster.

From the heat map, it is evident that the thyme extracts belonging to cluster D characterize with the highest antioxidant potential. Interestingly, two thyme samples (nos. 15 and 16) from this cluster represent two varieties of one and the same species (*T. serpyllum* "aureus" and *T. serpyllum* "albus," respectively).

Thyme species grouped in cluster C characterize with the lowest antioxidant potential. Moreover, it can be noticed that sample nos. 5 and 14 represent one and the same species (*T. citriodorus* "golden dwarf"), although extracts originated from two different parts of this plant, i.e., from the

leaves and rhizomes, respectively. Apparently, *T. citriodorus* “golden dwarf” as a whole characterizes with very low antioxidant potential.

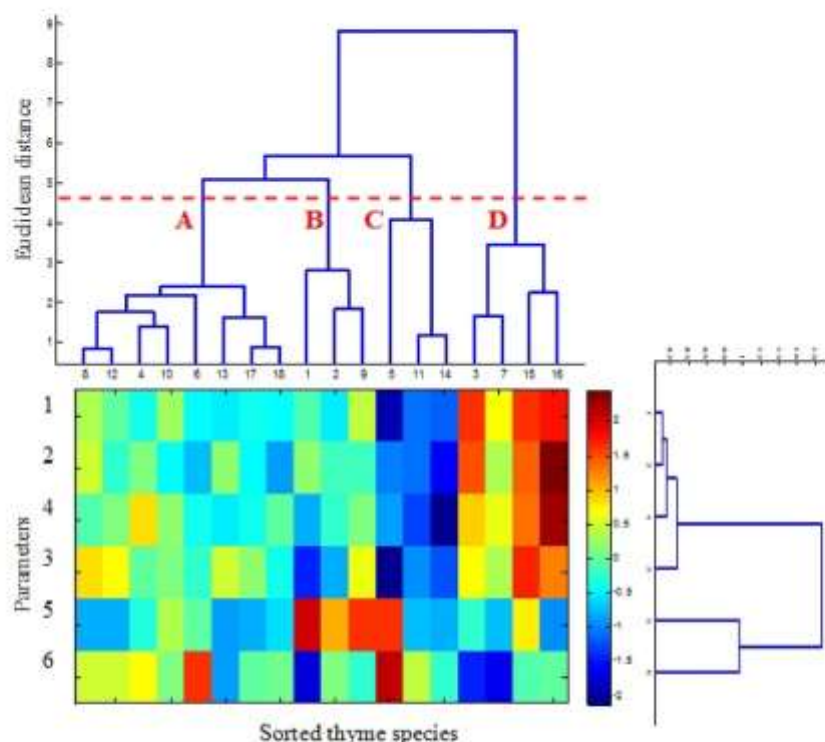


Fig. 1. Dendrogram of eighteen investigated thyme extracts based on their biological potential measured by the six different methods: methods 1–4, assessing antioxidant potential; method 5, assessing anticancer potential; and method 6, assessing antibacterial potential (the tree was constructed for autoscaled parameters with the Euclidean distance as a similarity measure and Ward’s linkage). Dendrogram is augmented with the heat map representing the autoscaled values of biological activities

Cluster B includes three thyme species, which characterize with the highest numerical values derived from anticancer test, hence, with the lowest anticancer potential. Interestingly, samples characterizing with the lowest numerical values derived from anticancer test (i.e., with the highest anticancer potential) belong to different clusters. These are samples no. 16 (*T. serpyllum* “albus” leaves commodity; cluster D), no. 17 (*T. serpyllum* leaves systematic; cluster A), and no. 13 (*T. pulegioides* subsp. *pulegioides* leaves commodity; cluster A).

In general, samples gathered in cluster A characterize with an average biological potential, and an exception are sample nos. 13 and 17 (characterizing with the highest anticancer potential) and sample no. 6 (*T. marschallianus*) which characterized with the second highest antibacterial potential.

### Principal Components Analysis, PCA

Another approach to the evaluation of numerical data acquired in the course of our studies was made with use of principal components analysis (PCA) [27]. Based on an assumption that data variability is due to the information content imbedded in the evaluated data, principal components were determined containing the highest amounts of data variability. Cumulative percent of data variance described by the first six principal components is shown in Fig. 2, and the first two principal components (PC1 and PC2) describe a high portion of the total data variance (equal to 78.58 %).

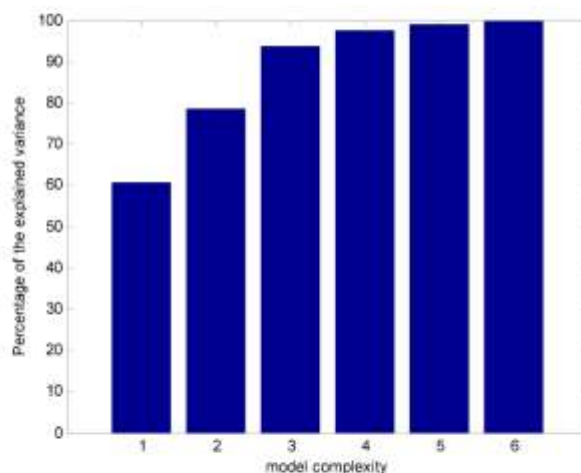


Fig. 2. The cumulative percentage of the explained data variance by the consecutive PCs

Projection of 18 thyme species with different biological activities on the plane defined by the first two principal components (PC1 and PC2) showed grouping of these species in four distinct clusters A, B, C, and D (Fig. 3(a)), and identical thyme extracts were grouped in these four clusters by means of hierarchical clustering and PCA.

Projection of the parameters on the plane defined by the first two principal components PC1 and PC2 (Fig. 3(b)) illustrates a degree of correlation

among them. Parameters 1–4 describing antioxidant properties are significantly correlated. Upon a more detailed scrutiny, it can be stated that parameters 1, 2, and 4 differ to an insignificant degree only, whereas parameter 3 is somewhat less strongly correlated than the rest. This observation can be interpreted in the following way. Parameters 1, 2, and 4 refer to analytical methods which all employ DPPH as a free radical standard (with gallic acid and trolox as two different free radical scavenger standards). Parameter 3 refers to analytical method which employs ABTS as a free radical standard (with gallic acid as a free radical scavenger standard). Apparently, the free radical standard is more important to obtain a similarity of the parameters referring to antioxidant potential of the compared extracts than the free radical scavenger standards.

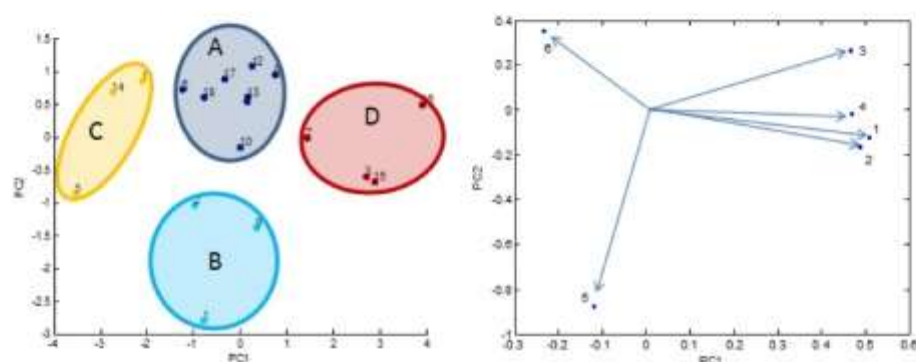


Fig. 3. Projection of (a) objects and (b) parameters on the plane defined by PC1 and PC2

Further, it can be stated that parameters 1–4 are negatively correlated with parameter 6, which describes antibacterial properties of the extracts. In other words, extracts with the strongly pronounced antioxidant potential exert relatively low antibacterial activity and vice versa. Moreover, parameters 1–4 and 6 are not correlated with parameter 5, which reflects anticancer activity of the examined thyme extracts (as the angles between the vectors of parameters 1–4 and parameter 6 on the one hand, and parameter 5 on the other are close to  $90^\circ$ ).

## Conclusion

Based on chemometrical evaluation of analytical results collected in this study, an observation can be made as to the dissimilarity of antioxidant, antibacterial, and anticancer properties of the 18 thyme extracts rich in polar



components (mostly in phenolic acids and flavonoids). Thus, a conclusion can be drawn that the molecular level mechanisms of these three activities are also different.

## Acknowledgement

One author (M.O.) acknowledges the financial support of the DoktorIS project, cofinanced by the European Union within the European Social Fund.

## References

- [1] L. Czerwiecki, *Roczniki PZH*, **60**(3), 201 (2009)
- [2] M.H.H. Roby, M.A. Sarhan, K.A.-H. Selim, and K.I. Khalel, *Ind. Crops Prod.*, **43**, 827 (2013)
- [3] F. Shahidi, AOCS Press, Champaign, IL, USA, 1 (1997)
- [4] N. Ito, A. Hagiwara, M. Shibata, T. Ogiso, and S. Fukushima, *Gann*, **73**, 332 (1982)
- [5] A. Wojdyło, J. Oszmiański, and R. Czemerys, *Food Chem.*, **105**, 940 (2007)
- [6] R. Amarowicz, Z. Żegarska, R. Rafałowski, R.B. Pegg, M. Karamać, and A. Kosińska, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **111**, 1111 (2009)
- [7] J.K. Moon and T. Shibamoto, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1655 (2009)
- [8] I. Jabri-Karoui, I. Bettaieb, K. Msaada, M. Hammami, and B. Marzouk, *J. Funct. Foods*, **4**, 661 (2012)
- [9] B. Nickavar and N. Esbati, *J. Acupunct. Meridian Stud.*, **5**, 119 (2012)
- [10] C.A. Simões-Pires, B. Hmicha, A. Marston, and K. Hostettmann, *Phytochem. Anal.*, **20**, 511 (2009)
- [11] Ch. Weins and H. Jork, *J. Chromatogr. A*, **750**, 403 (1996)
- [12] I.M. Choma and E.M. Grzelak, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 2684 (2011)
- [13] E.M. Grzelak, W. Jesionek, B. Majer-Dziedzic, and I.M. Choma, *J. AOAC Int.*, **96**, 1167 (2013)
- [14] S. Nejad Ebrahimi, J. Hadian, M.H. Mirjalili, A. Sonboli, and M. Yousefzadi, *Food Chem.*, **110**, 927 (2008)
- [15] N.K. Fayad, O.H.S. Al-Obaidi, T.H. Al-Noor, and M.O. Ezzat, *Innovative Syst. Des. Eng.*, **4**(1), 41 (2013)
- [16] Á.M. Móricz, G. Horváth, P. Molnár, B. Kocsis, A. Böszörményi, É. Lemberkovics, and P.G. Ott, *J. Planar Chromatogr.*, **23**, 406 (2010)
- [17] M. Orłowska, W. Jesionek, B. Majer-Dziedzic, G. Szymczak, I.M. Choma, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, and M. Sajewicz, *J. AOAC Int.* – in press.
- [18] B. Boros, S. Jakabová, Á. Dörnyei, G. Horváth, Z. Pluháre, F. Kilár, and A. Felinger, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 7972 (2010)
- [19] Ch.M. Kaefer and J.A. Milner, *J. Nutr. Biochem.*, **19**, 347 (2008)
- [20] D.D. Deb, G. Parimala, S.S. Devi, and T. Chakraborty, *Chem.-Biol. Interact.*, **193**, 97 (2011)
- [21] E. Kassi, I. Chinou, E. Spilioti, A. Tsiapara, K. Graikou, S. Karabournioti, M. Manoussakis, and P. Moutsatsou, *Phytomedicine*, **21**, 1483 (2014)

- [22] M. Orlowska, I. Stanimirova, D. Staszek, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, and T. Kowalska, *J. AOAC Int.*, **97**(5), 1274 (2014)
- [23] M. Orlowska, K. Pytlakowska, M. Bartoszek, J. Polak, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, and T. Kowalska, *J. AOAC Int.* - in press.
- [24] M.C. Boutron-Ruault, P. Senesse, J. Faivre, N. Chatelain, C. Belghiti, and S. Méance, *Eur. J. Cancer Prev.*, **8**, 229 (1999)
- [25] C. Braga, C. La Vecchia, S. Franceschi, E. Negri, M. Parpinel, A. Decarli, A. Giacosa, and D. Trichopoulos, *Cancer*, **82**, 448 (1998)
- [26] I. Lee and J. Yang, *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, **2**, 577 (2009)
- [27] K.H. Esbensen and P. Geladi, *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, **2**, 211 (2009)

Accepted by TK